



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**

**«Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*«Συγκριτική αξιολόγηση της επάρκειας της δοκιμής της φωσφατάσης για τον έλεγχο της παστερίωσης σε μη αγελαδινό γάλα.»*

Ασημώ Κ. Τσιαμίτα

Γεωπόνος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, 2021



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**

**«Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*«Συγκριτική αξιολόγηση της επάρκειας της δοκιμής της φωσφατάσης για τον έλεγχο της παστερίωσης σε μη αγελαδινό γάλα.»*

**Ασημώ Κ. Τσιαμίτα**

**Γεωπόνος Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

**Λάρισα, 2021**

## Προτεινόμενη τριμελής επιτροπή

**1. Ελένη Μαλισσιόβα**

Επιβλέπουσα  
Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήμα Επιστήμης  
Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**2. Αθανάσιος Μανούρας**

Μέλος τριμελούς επιτροπής  
Καθηγητής, Τμήμα Διαιτολογίας και  
Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**3. Φώτης Παπαδήμας**

Μέλος τριμελούς επιτροπής  
Αναπληρωτής Καθηγητής Επιστήμης Γάλακτος,  
Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ζήτηση του μη αγελαδινού γάλακτος συνεχώς αυξάνεται και έτσι καθίσταται αναγκαία η σωστή και αποτελεσματική παστερίωση. Οι τυπικές πρακτικές για την αξιολόγηση της παστερίωσης του γάλακτος βασίζονται κυρίως στη θερμική απενεργοποίηση της κινητικής ενός ενδογενούς ενζύμου, της αλκαλικής φωσφατάσης. Η δοκιμή της φωσφατάσης αποτελεί μια γρήγορη δοκιμή ελέγχου της επιτυχούς παστερίωσης που αρχικά σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε για την παστερίωση του αγελαδινού γάλακτος, που καταναλώνεται κυρίως ως πόσιμο γάλα. Παρόλα αυτά, η γρήγορη αυτή δοκιμή πολύ συχνά χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της παστερίωσης και σε μη αγελαδινά γάλατα, χωρίς να υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την καταλληλότητα της. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η συγκριτική αξιολόγηση της επάρκειας των διαθέσιμων εμπορικά δοκιμών για το προσδιορισμό της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης σε μη-αγελαδινά γάλατα.

Συνολικά συλλέχθηκαν 12 δείγματα γάλακτος (αίγαιο, πρόβειο, βουβαλίσιο γάλα, γάλα καμήλας ονόγαλα και αγελαδινό. Τα δείγματα παστεριώθηκαν με την ταχεία και βραδεία μέθοδο. Το σύνολο των δειγμάτων που αξιολογήθηκαν ήταν 72, δεδομένου ότι όλες οι αναλύσεις έγιναν εις διπλούν.

Πραγματοποιήθηκε αρχικά μικροβιολογικός έλεγχος των νωπών και παστεριωμένων δειγμάτων γάλακτος (OMX και εντεροβακτηριοειδη) με εφαρμογή των μεθόδων αναφοράς ISO, ώστε να διαπιστωθεί η επιδραση της θερμικής επεξεργασίας που εφαρμόστηκε στα νωπά δείγματα.

Επιπλέον, τα δείγματα αναλύθηκαν με 3 ποιοτικές (Lactognost, Phosphatesmo, Kairosafe) και 3 ποσοτικές (ZymoSnap, Fluorophos και PasLite) δοκιμές προσδιορισμού της αλκαλικής φωσφατάσης. Τέλος, τα αναλυτικά αποτελέσματα αξιολογήθηκαν συγκριτικά.

Ο μικροβιολογικός έλεγχος έδειξε ότι η θερμική επεξεργασία (ταχεία και βραδεία παστερίωση) που εφαρμόστηκε, είχε επίπτωση στο μικροβιακό φορτίο. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων της αλκαλικής φωσφατάσης έδειξαν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δοκιμών, εγείροντας προβληματισμό για την αξιοπιστία τους ως δείκτες παστερίωσης διάφορων ειδών γάλακτος. Ιδιαίτερα, στο γάλα καμήλας, όνου, φαίνεται ότι η δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης δεν ενδείκνυται για την πιστοποίηση της παστερίωσης. Για το πρόβειο και γίδινο γάλα υπάρχουν επίσης αποκλίσεις τόσο στα ποιοτικά όσο και στα ποσοτικά τεστ, που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνάδουν με την πρόσφατη ανακοίνωση της EFSA για διερεύνηση άλλων πιθανών τρόπων αξιολόγησης της παστερίωσης του μη-αγελαδινού γάλακτος, προκειμένου να διασφαλίζεται σε κάθε περίπτωση ο καταναλωτής και η Δημόσια Υγεία.

**Λέξεις- κλειδιά:** αλκαλική φωσφατάση, παστερίωση, αίγαιο γάλα, πρόβειο γάλα, βουβαλίσιο γάλα, γάλα καμήλας, ονόγαλα, ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), enterobacteriaceae

## ABSTRACT

The demand for non-cow milk is constantly increasing and thus the correct and effective pasteurization becomes necessary. Typical practices for evaluating milk pasteurization are mainly based on the thermal inactivation of the kinetics of an endogenous enzyme, alkaline phosphatase. The phosphatase test is a rapid test of successful pasteurization that was originally designed and applied to pasteurize cow's milk, which is consumed primarily as drinking milk. However, this rapid test is often used to control pasteurization in non-cow's milk, without sufficient data on its suitability. The purpose of this dissertation was the comparative evaluation of the adequacy of commercially available tests for the determination of alkaline phosphatase activity in non-cow milk.

12 milk samples were collected (goat's, sheep's, buffalo's milk, camel's milk and cow's milk). The samples were pasteurized by the fast and slow method. The total of the evaluated samples was 72, since all analyzes were performed in duplicate. Microbiological testing of fresh and pasteurized milk samples (total mesophilic flora and enterobacteriaceae) was initially performed using ISO reference methods to determine the effect of the heat treatment applied to the fresh samples.

In addition, the samples were analyzed by 3 qualitative (Lactognost, Phosphatesmo, Kairosafe) and 3 quantitative (ZymoSnap, Fluorophos and PasLite) alkaline phosphatase assays. Finally, the analytical results were evaluated comparatively.

The microbiological test showed that the applied heat treatment (fast and slow pasteurization), had an effect on the microbial load. The results of alkaline phosphatase assays showed differences between the different tests, raising concerns about their reliability as pasteurization markers of different types of milk. In camel milk in particular, however, it appears that the alkaline phosphatase test is not suitable for pasteurization certification. For sheep and goat milk there are also discrepancies in both qualitative and quantitative tests, which need further investigation. The findings of the present study are consistent with EFSA's recent announcement to explore other possible ways to evaluate pasteurization of non-cow's milk, in order to ensure in each case the consumer and Public Health.

**Keywords:** alkaline phosphatase, pasteurization, goat's milk, sheep's milk, buffalo milk, camel's milk, donkey's milk, total mesophilic flora (IMF), enterobacteriaceae

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	III
ABSTRACT .....	IV
Περιεχόμενα πινάκων.....	VIII
Περιεχόμενα γραφημάτων.....	VIII
Περιεχόμενα εικόνων.....	IX
Συντμήσεις και όροι.....	X
Ευχαριστίες .....	XI
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	2
2.1: Το Γάλα.....	2
2.1.1 Γενικές πληροφορίες.....	2
2.1.2 Διαφορές στη σύνθεση του γάλακτος από διαφορετικά είδη .....	3
2.2 Μικροβίωμα και Μικροβιολογικοί κίνδυνοι που σχετίζονται με την κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων .....	3
2.2.1. Γενικά.....	3
2.2.2. Σε αγελαδινό γάλα .....	4
2.2.3. Σε αίγιο γάλα .....	5
2.2.4. Σε πρόβιο γάλα .....	5
2.2.5. Σε βουβαλίσιο γάλα .....	5
2.2.6. Σε γάλα καμήλας .....	6
2.2.7. Σε ονόγαλα.....	6
2.2.8 Βακτηριακοί δείκτες .....	6
2.3 Θερμική Επεξεργασία.....	7
2.3.1 Θέρμανση –θερμοποίηση .....	8
2.3.2. Βακτηριοκάθαρση.....	8
2.3.3. Παστερίωση .....	9
2.3.4. Υψηλή παστερίωση .....	11
2.4 Αλκαλική Φωσφατάση .....	12
2.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά .....	12
2.4.2 Χαρακτηριστικά ALP στο γάλα.....	13
2.4.3. Μικροβιακή Αλκαλική Φωσφατάση.....	15

2.4.4 Θερμική απενεργοποίηση ALP .....	16
2.4.5 Μη θερμική απενεργοποίηση ALP .....	16
2.4.6. Μέθοδοι Ανάλυσης – Ανίχνευσης ALP στο γάλα και τα προϊόντα του και περιορισμοί των μεθόδων.....	17
2.4.6.1 Χρωματομετρικές Τεχνικές.....	19
2.4.6.2. Ανοσοχημικές Τεχνικές .....	21
2.4.6.3. Φθορισμομετρικές Τεχνικές και Τεχνικές Χημειοφωταύγειας.....	23
2.4.7. Παράγοντες που επηρεάζουν την παρουσία της ALP στο γάλα.....	27
2.4.8. Επανενεργοποίηση της Αλκαλικής Φωσφατάσης.....	29
2.4.9. Διαχωρισμός ανάμεσα στην Υπολειμματική και την Επανενεργοποιημένη Αλκαλική Φωσφατάση.....	31
2.4.10. Αλκαλική Φωσφατάση σε Μη-Αγελαδινά Γαλακτοκομικά Προϊόντα .....	31
2.4.11 Ζητήματα – περιορισμοί που προκύπτουν από τις δοκιμές ALP στο γάλα.....	35
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	36
3.1 Δειγματοληψία .....	36
3.2 Επεξεργασία Δειγμάτων (ταχεία και βραδεία παστερίωση) .....	37
3.2.1 Υλικά-Μέθοδοι.....	37
3.3 Μικροβιολογικός Έλεγχος Δειγμάτων.....	38
3.3.1. Προσδιορισμός OMX.....	38
3.3.1.1 Υλικά-Μέθοδοι .....	38
3.3.2. Προσδιορισμός Εντεροβακτηριοειδών.....	42
3.3.2.1 Υλικά-Μέθοδοι .....	42
3.4 Προσδιορισμός δραστηριότητας αλκαλικής φωσφατάσης με ποιοτικές δοκιμές.....	48
3.4.1 Υλικά-Μέθοδοι.....	48
3.5 Προσδιορισμός δραστηριότητας αλκαλικής φωσφατάσης με ποσοτικές δοκιμές.....	54
3.5.1 Υλικά-Μέθοδοι.....	54
3.6 Συγκριτική Αξιολόγηση αποτελεσμάτων.....	61
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	61
4.1. Περιγραφή δείγματος.....	61
4.2. Μικροβιολογικά αποτελέσματα .....	61
4.2.1. OMX.....	61
4.2.2 Εντεροβακτηριοειδή .....	63
4.3. Ποιοτικές δοκιμές Αλκαλικής Φωσφατάσης.....	66

4.3.1. <i>Lactognost</i> .....	66
4.3.2. <i>Phospatesmo</i> .....	67
4.3.3 <i>Kairosafe</i> .....	68
4.4. Ποσοτικές δοκιμές Αλκαλικής Φωσφατάσης .....	69
4.4.1 <i>Zymosnap</i> .....	69
4.4.2 <i>Paslite</i> .....	70
4.4.3 <i>Fluorophos</i> .....	71
4.5. Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων .....	72
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	76
5.1 Συζήτηση.....	76
5.2 Συμπεράσματα.....	79
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80



## Περιεχόμενα πινάκων

<b>Πίνακας I:</b> Η εκατοστιαία σύσταση του γάλακτος ανά είδος θηλαστικού.....	2
<b>Πίνακας II:</b> Περίπτωση υποκατάστασης του μεταλλικού κέντρου στις περιοχές των Zn <sup>2+</sup> και Mg <sup>2+</sup> , σε ανθρώπινο, αγελαδινό και πρόβειο γάλα.....	14
<b>Πίνακας III:</b> Ποσοστό % λιποπεριεκτικότητας σε θηλαστικά.....	28
<b>Πίνακας IV:</b> Υλικά και Σκεύη για τη συλλογή των δειγμάτων και την παστερίωσή τους.....	37
<b>Πίνακας V:</b> Υλικά για τον προσδιορισμό OMX.....	39
<b>Πίνακας VI:</b> Υλικά , Σκεύη και Αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό Εντεροβακτηριοειδών.....	43
<b>Πίνακας VII:</b> Υλικά και Αντιδραστήρια για τη ποιοτική δοκιμήALP - Lactognost.....	49
<b>Πίνακας VIII:</b> Υλικά για τη ποιοτική δοκιμήALP - Phosphatesmo.....	52
<b>Πίνακας IX:</b> Υλικά και Αντιδραστήρια για τη δοκιμή ποιοτική δοκιμήALP - Kairosafe.....	53
<b>Πίνακας X:</b> Υλικά και Αντιδραστήρια για τη δοκιμή ZymoSnap (Hygiena).....	55
<b>Πίνακας XI:</b> Σκεύη, Όργανα και Αντιδραστήρια για τη δοκιμή PasLite.....	57
<b>Πίνακας XII:</b> Υλικά και Αντιδραστήρια για τη δοκιμή Fluorophos.....	59
<b>Πίνακας XIII:</b> Είδος και αριθμός δειγμάτων.....	61
<b>Πίνακας XIV:</b> Συγκεντρωτικά αποτελέσματα OMX σε cfu/ml.....	62
<b>Πίνακας XV:</b> Συγκεντρωτικά αποτελέσματα Enterobacteriaceae σε cfu/ml.....	63
<b>Πίνακας XVI:</b> Αποτελέσματα Maldi.....	65
<b>Πίνακας XVII:</b> : Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Lactognost.....	66
<b>Πίνακας XVIII:</b> : Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Phosphatesmo.....	67
<b>Πίνακας XIX:</b> : Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Kairosafe.....	68
<b>Πίνακας XX:</b> : Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Zymosnap.....	69
<b>Πίνακας XXI:</b> : Αναλυτικός Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Zymosnap.....	69
<b>Πίνακας XXII:</b> : Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Paslite.....	70
<b>Πίνακας XXIII:</b> : Αναλυτικός Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Paslite.....	70
<b>Πίνακας XXIV:</b> : Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Fluorophos.....	71
<b>Πίνακας XXV:</b> : Αναλυτικός Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Fluorophos.....	71
<b>Πίνακας XXVI:</b> Συγκεντρωτικός συγκριτικός πίνακας και των 6 kit.....	73

## Περιεχόμενα γραφημάτων

<b>Διάγραμμα I :</b> Σύγκριση ποσοτικών kit για τα παστεριωμένα δείγματα με την ταχεία μέθοδο.....	74
<b>Διάγραμμα II :</b> Σύγκριση ποσοτικών kit για τα παστεριωμένα δείγματα με την Βραδεία μέθοδο.....	75
<b>Διάγραμμα III :</b> Σύγκριση ποσοτικών kit συγκεντρωτικά.....	75

## Περιεχόμενα εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Διαδικασία Παστερίωσης.....	10
<b>Εικόνα 2:</b> Αλκαλική Φωσφατάση του <i>E. Coli</i> .....	13
<b>Εικόνα 3.</b> Γενική λογική για τον προσδιορισμό της κατάστασης παστερίωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων που δοκιμάστηκαν με τον προσδιορισμό αλκαλικής φωσφατάσης (ALP).....	18
<b>Εικόνα 4.</b> Οι χημικές αντιδράσεις που περιγράφουν την Μέθοδο Scharer για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της ALP .....	20
<b>Εικόνα 5.</b> Οι χημικές αντιδράσεις που περιγράφουν την Μέθοδο Rutgers για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της ALP.....	20
<b>Εικόνα 6.</b> Οι χημικές αντιδράσεις που περιγράφουν την Μέθοδο Aschaffenburg και Mullen για τον κολοριμετρικό προσδιορισμό της ALP .....	21
<b>Εικόνα 7.</b> Φθορισμόμετρο .....	26
<b>Εικόνα 8.</b> Αναλυτής Χημειοφωταύγειας .....	27
<b>Εικόνα 9.</b> Διαδικασία ταχείας παστερίωσης στο υδατόλουτρο.....	38
<b>Εικόνα 10.</b> Ενοφθαλμισμός του νοπού δείγματος και των περαιτέρω αραιώσεων, στα τρυβλία Petri.....	40
<b>Εικόνα 11.</b> Δείγμα 31, με μια αραιώση.....	41
<b>Εικόνα 12.</b> Δείγμα 31, με τέσσερις αραιώσεις.....	41
<b>Εικόνα 13.</b> Τρυβλίο Petri, με 2 αποικίες OMX.. ..	42
<b>Εικόνα 14.</b> Τρυβλίο Petri, με 21 αποικίες OMX.....	42
<b>Εικόνα 15.</b> Τρυβλία Petri με αποικίες <i>enterobacteriaceae</i> με γυμνό μάτι.....	44
<b>Εικόνα 16.</b> Τρυβλίο Petri με αποικίες <i>Enterobacteriaceae</i> , στο μικροσκόπιο.....	44
<b>Εικόνα 17.</b> Προετοιμασία των αραιώσεων.....	45
<b>Εικόνα 18.</b> Θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA και PCA.....	45
<b>Εικόνα 19.</b> Τρυβλία Petri, μετά την επώασή τους.....	45
<b>Εικόνα 20.</b> Τρυβλίο Petri με ανακαλλιέργειες.....	46
<b>Εικόνα 21.</b> Η μεταλλική πλακέτα για την ταυτοποίηση των μικροβίων με MALDI-TOF.....	47
<b>Εικόνα 22.</b> Το φύλλο εργασίας για την ταυτοποίηση των μικροβίων με MALDI-TOF MS. ....	47
<b>Εικόνα 23.</b> Ταμπλέτες lactognost I, lactognost II και σκόνη lactognost III.....	48
<b>Εικόνα 24.</b> Τοποθέτηση των ταμπλετών στους δοκιμαστικούς σωλήνες.....	50
<b>Εικόνα 25.</b> Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν στον κλίβανο στους 37 οC για 1 ώρα.....	50
<b>Εικόνα 26.</b> Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν στον κλίβανο στους 37 οC για 1 ώρα.....	50
<b>Εικόνα 27.</b> Οι δοκιμαστικοί σωλήνες κατεργάστηκαν με τη σκόνη Lactognost III...51	
<b>Εικόνα 28.</b> Δοχείο που περιέχει τις ταινίες μέτρησης PHOSPHATESMO.....	51
<b>Εικόνα 29.</b> Χρωματισμός ταινίας Phosphatesmo μετά την διατήρηση στους 36 °C για 1 ώρα.....	52
<b>Εικόνα 30.</b> Τα αντιδραστήρια της δοκιμής Kairosafe.....	53
<b>Εικόνα 31.</b> Δοκιμή Kairosafe.....	54
<b>Εικόνα 32.</b> Αποτέλεσμα της ανάλυσης Zymosnap.....	56
<b>Εικόνα 33.</b> Τα διαθέσιμα αντιδραστήρια PasLite.....	58
<b>Εικόνα 34.</b> Δοκιμή αλκαλικής φωσφατάσης με Fluorophos.....	60

### Συντμήσεις και όροι

**SCC** : Somatic Cell Count, περιεκτικότητα σε σωματικά κύτταρα  
**PCBs** : Polychlorinated biphenyls ,πολυχλωριωμένα διφαινύλια  
**LAB**: Lactic Acid Bacteria, οξυγαλακτικά βακτήρια  
**LTLT** : Low-Temperature, Long-Time, βραδεία παστερίωση  
**HTST**: High-Temperature, Short-Time , ταχεία παστερίωση  
**UHT**: Ultra High Temperature , παστερίωση εξαιρετικά υψηλής θερμοκρασίας  
**ALP** : Alkaline Phosphatase , αλκαλική φωσφατάση  
**ESL** : Extended Shelf-Life Milk, γάλα εκτεταμένης διάρκειας ζωής  
**MFGM** : Milk Fat Globule Membrane, μεμβράνη σφαιριδίων λίπους γάλακτος  
**MFO-3** : Official Canadian Method , Επίσημη Καναδική Μέθοδος MFO-3  
**PAb** : πολυκλωνικών αντισωμάτων  
**PMO**: project management office, Γραφείο Διαχείρισης και Εκκαθάρισης των Ατομικών Δικαιωμάτων  
**AFFSA**: French Food Safety Agency  
**TOF**: Time of Flight, Χρόνος Πτήσης  
**OMX**: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα  
**Coliforms** : Κολοβακτηρίδια  
**PE**: πολυαιθυλένιο  
**RLUs** : Relative Light Units  
**FDA**: Food and Drug Administration, Οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων  
**NCIMS**: National Conference on Interstate Milk Shipments, Εθνικό συνέδριο για τις διακρατικές αποστολές γάλακτος  
**IDF**: International Dairy Federation, Διεθνής Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών  
**PEF**: Pulsed Electric Fields, Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά κύριο λόγο στο εργαστήριο του Τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ( κτίριο Κατσίγρα), και ένα μέρος της στο εργαστήριο του Τμήματος Ζωικής παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της κας Ελένης Μαλισσιόβα.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Ελένη Μαλισσιόβα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή, αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω για την επιστημονική καθοδήγηση, τις υποδείξεις της, τις επιπλέον γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε , για την επιμονή της και την συνεχή υποστήριξή της από την αρχή μέχρι το τέλος της συγκεκριμένης διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο προσωπικό του εργαστηρίου του τμήματος Ιατρικής και πιο συγκεκριμένα, στην κ. Φωτεινή Κολοκυθοπούλου, για την πολύτιμη βοήθειά της για την περάτωση της πειραματικής διαδικασίας, τη στήριξή της και τις υποδείξεις που ήταν απολύτως απαραίτητες.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου τροφίμων ζωϊκής προέλευσης του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής , του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Νικόλαο Νατσαρίδη , για την πολύτιμη βοήθειά του στη διεξαγωγή ενός μέρους του πειράματος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στον κ. Σπύρο Μάρκο, Βιολόγο – Βιοτεχνολόγο Τροφίμων της εταιρείας ΒΙΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΑΕ , για την προσφορά τους και την πολύτιμη καθοδήγησή του καθώς και τις εταιρείες ΘΕΣΓΑΛΑ, για την παραχώρηση κάποιων απαραίτητων αναλώσιμων, και ΔΕΛΤΑ, για τη βοήθεια διεξαγωγής κάποιων αποτελεσμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια και για ό,τι έχω καταφέρει μέχρι τώρα, και στους φίλους μου για την ενθάρρυνσή τους.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αλκαλική φωσφατάση, η οποία μελετάται στην συγκεκριμένη εργασία, είναι ένα ένζυμο, και πιο συγκεκριμένα μια γλυκοπρωτεΐνη που καταλύει την υδρόλυση μονοεστέρων φωσφορικού οξέος σε αλκαλικό περιβάλλον και βρίσκεται στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων. Επίσης μία μικρότερη ποσότητα προέρχεται από τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα του μαστού και βρίσκεται στο άπαχο γάλα. (Milan, 2006).

Η αλκαλική φωσφατάση υπάρχει σε όλα τα νωπά γάλατα, καταστρέφεται με την παστερίωσή τους και η αδρανοποίησή της χρησιμοποιείται ως δείκτης από την νομοθεσία, για την σωστή και αποτελεσματική παστερίωση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η θερμική σταθερότητα της αλκαλικής φωσφατάσης είναι πολύ μεγαλύτερη από άλλων παθογόνων και άλλων ενζύμων που πιθανώς υπάρχουν στο γάλα. Η πλήρης και σωστή παστερίωση απενεργοποιεί το ένζυμο σε επίπεδα τέτοια ώστε να μην είναι ανιχνεύσιμο. Παρ' όλα αυτά η αποτυχία εντοπισμού της σε κάποια είδη γάλακτος πιθανόν να μην εγγυάται ότι το προϊόν δεν περιέχει παθογόνα.(EFSA,2021).

Πρόσφατα η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA ) δημοσίευσε έκθεση σχετικά με τη χρήση και τους περιορισμούς της ALP για την αξιολόγηση της παστερίωσης σε μη αγελαδινό γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα και τις πιθανές εναλλακτικές δοκιμές για την επαλήθευση της θερμικής επεξεργασίας σε μη αγελαδινά γαλακτοκομικά προϊόντα. Ανάλογα με το είδος και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος, η ποσότητα του ενζύμου διαφέρει σημαντικά, και επηρεάζεται από το είδος, το ποσοστό λίπους του κάθε είδους γάλακτος, την πιθανότητα επανενεργοποίησής του, καθώς και τη διαδικασία και τις συνθήκες της παστερίωσης. (EFSA, 2021).

Σύμφωνα με τα δεδομένα της EFSA οι μέθοδοι HTST και LTLT, που εφαρμόζονται μέχρι στιγμής για την παστερίωση του αγελαδινού γάλακτος λειτουργούν άριστα στο αγελαδινό γάλα και δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα δραστηριότητας ALP <350 mU / L. (EFSA, 2021).

Δεδομένου ότι είναι πολύ σημαντικό η δραστηριότητα της ALP να βρίσκεται κάτω από τα νομοθετημένα αυστηρά όρια, γεγονός που έμμεσα σημαίνει πως το γάλα είναι απαλλαγμένο από τα παθογόνα, άρα ασφαλές. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής είναι η συγκριτική αξιολόγηση των εμπορικά διαθέσιμων κιτ δοκιμής φωσφατάσης για τον έλεγχο της επιτυχούς παστερίωσης σε μη-αγελαδινό γάλα και η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με το μικροβιολογικό προφίλ των δειγμάτων.

## 2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1: Το Γάλα

#### 2.1.1 Γενικές πληροφορίες

Σε ολόκληρο τον κόσμο, η ένταξη του γάλακτος στη διατροφή των ανθρώπων, είναι εξέχουσας σημασίας. Ξεκινά με την διατροφή των νεογνών, τα οποία τρέφονται αποκλειστικά με μητρικό γάλα, ή σκευάσματα αντίστοιχης θρεπτικής αξίας, ενώ συνεχίζεται κατά την εφηβική και ενήλικη ζωή τους. Τη διατροφή συμπληρώνουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το τυρί, η γιαούρτη, το βούτυρο. Το γάλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσιο σε διαφορετικές αναλογίες για την παραγωγή προϊόντων όπως το παγωτό, η σοκολάτα, ή και άλλα προϊόντα ζαχαροπλαστικής.

Με τον όρο γάλα εννοούμε, γενικά, το προϊόν άμελξης των θηλαστικών (Van Winckel et al., 2011). Από τη φύση, το γάλα έχει ως στόχο να θρέψει το νεογνό όλων των θηλαστικών που το παράγουν. Η ανάγκη για θρεπτικά συστατικά σε κάθε είδος ζώου, ποικίλει ανάλογα με την πηγή. Συνεπώς, και η σύσταση του γάλακτος ενός είδους ποικίλει ανάλογα με τη ράτσα, την ηλικία, την ώρα άμελξης, την εποχή, το είδος της διατροφής και τη σωματική κατάσταση (Pehrsson et al., 2000). Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας I), αναπαρίσταται η εκατοστιαία σύσταση του γάλακτος ανά είδος θηλαστικού. Στην ανθρώπινη διατροφή χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο το γάλα αγελάδας, κατσίκας, προβάτου και βούβαλου.

***Πίνακας I: Η εκατοστιαία σύσταση του γάλακτος ανά είδος θηλαστικού.***

Είδος	Ολική Πρωτεΐνη %	Λίπος %	Λακτόζη %	Τέφρα
Άνθρωπος	0,9 – 1,7	3,5 – 4,0	6,3 - 7,0	0,2 – 0,3
Αγελάδα	3,1 – 3,8	3,5 – 3,9	4,4 – 4,9	0,7 - 0,8
Αίγα	3,6	6,4	4,6 – 4,7	0,8 – 0,9
Πρόβατο	5,8	7,6	4,5	0,9 – 0,95
Βούβαλος	4,0	7,5	4,8	0,7
Όνος	1,5 – 1,8	0,3 – 1,8	5,8 – 7,4	0,3 – 0,5

(Rafiq et al., 2016, Han et al., 2012, Guo et al., 2007, Hadjipanayiotou, 1995)

Εκτός από τα στοιχεία του πίνακα, στο γάλα συναντώνται και βιταμίνες, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή των θηλαστικών. Προσδίδουν χαρακτηριστικά στο τρόφιμο, που επιφέρουν την υγεία στον οργανισμό που τα προσλαμβάνει. Οι βιταμίνες του γάλακτος χωρίζονται σε λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές. Οι μεν λιποδιαλυτές, απαντούν στο γαλακτικό λίπος και είναι οι βιταμίνες E, D, A και K. Οι δε υδατοδιαλυτές, δηλαδή οι βιταμίνες B και C, απαντούν στον ορό του γάλακτος (Hartman & Dryden, 1965). Αποτελεί επίσης πηγή βασικών αμινοξέων και μετάλλων, και κυρίως του ασβεστίου. (Ritota et al., 2017).

### **2.1.2 Διαφορές στη σύνθεση του γάλακτος από διαφορετικά είδη**

Η σύνθεση του γάλακτος εξαρτάται από το είδος του ζώου, αν πρόκειται για αγελάδα, πρόβατο, καμήλα κ.ο.κ, τη φυλή, το στάδιο γαλουχίας, τις τυχόν μαστικές λοιμώξεις και τις ζωοτροφές. (EFSA , 2015, EFSA ,2021).

Το αγελαδινό γάλα φαίνεται να έχει μεγαλύτερη σταθερότητα, όσον αφορά τη σύνθεση, συγκριτικά με το αιγοπρόβειο, το οποίο παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την σίτιση του ζώου και το στάδιο γαλουχίας , το οποίο διαφέρει από φυλή σε φυλή. Επίσης, το αιγοπρόβειο γάλα έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε στερεά, κυρίως λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε λίπος και πρωτεΐνες.

Σχετικά με το βουβαλίσιο γάλα έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα καζεΐνης και λιπαρών από τα υπόλοιπα είδη, ενώ το ονόγαλα παρατηρήθηκε να διαθέτει τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά, καζεΐνες και πρωτεΐνες, αλλά τη υψηλότερη περιεκτικότητα σε λακτόζη.

Τέλος, όσον αφορά την πρωτεΐνη ορού γάλακτος, έχει πανομοιότυπη περιεκτικότητα σε όλα τα είδη, με εξαίρεση το γάλα καμήλας, στο οποίο βρέθηκε πως η β- λακτοσφαιρίνη είναι η πρωτεΐνη που βρίσκεται σε πλεόνασμα στον ορό γάλακτος. (EFSA, 2021).

## **2.2 Μικροβίωμα και Μικροβιολογικοί κίνδυνοι που σχετίζονται με την κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων**

### **2.2.1. Γενικά**

Το γάλα αποτελεί ένα ιδιαίτερο υπόστρωμα για την ανάπτυξη πολλών παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, που μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στην υγεία του καταναλωτή ή και να υποβαθμίσουν ποιοτικά το τελικό προϊόν. Ωστόσο, οι ίδιοι μικροοργανισμοί διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαμόρφωση των ειδικών χαρακτηριστικών των τελικών γαλακτοκομικών προϊόντων. Πράγματι, η πολύπλοκη σύνθεση του γάλακτος (και όλα τα παράγωγά του κατά τα επόμενα στάδια



επεξεργασίας) παρέχει μια πλούσια πηγή θρεπτικών ουσιών, επιτρέποντας τη βέλτιστη ανάπτυξη μιας ευρείας σειράς μικροοργανισμών διαφορετικής προέλευσης. Εδώ, ο μικροβιακός μεταβολισμός ενός επιλεγμένου αριθμού αποικιστικών βακτηρίων μετατρέπει τα συστατικά του γάλακτος, κυρίως τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες, σε δευτερεύοντα προϊόντα που θα μπορούσαν περαιτέρω να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό άλλων μικροοργανισμών. Αυτά, με τη σειρά τους, συμβάλλουν σημαντικά στη σύνθεση του τελικού προϊόντος (Tilocca et al., 2020).

Το μικροβίωμα που σχετίζεται με το γάλα, συντελεί στην ανάπτυξη έντονης ποικιλότητας μικροοργανισμών, με τα βακτήρια να κατέχουν εξέχοντα ρόλο. Ακολουθούν οι ζύμες και οι μύκητες (Quigley et al., 2013, Montel et al., 2014). Στο σύνολο του μικροβιώματος εντοπίζονται τόσο κατά Gram αρνητικά (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, και *Enterobacteriaceae*), όσο και κατά Gram θετικά βακτήρια (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*) (Pino et al., 2018). Όπως είναι αναμενόμενο, η ύπαρξη ή μη, καθώς και η συγκέντρωση των εν λόγω μικροοργανισμών εξαρτάται άμεσα από το υπόστρωμα και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

Οι πηγές προέλευσης των μικροβίων στο γάλα μπορεί να είναι είτε από την άμεση επαφή με τον εξοπλισμό που χρησιμοποιείται για την άμελξη και τις δεξαμενές αποθήκευσης, είτε έμμεσα από τις ζωοτροφές, το πόσιμο νερό, τον αέρα, το έδαφος και τα απορρίμματα. Για το λόγο αυτό είναι πρωταρχικής σημασίας και ο τακτικός και άσηπτος καθαρισμός τόσο του χώρου και του εξοπλισμού, όσο και των θηλών του ζώου. (Montel et al., 2014). Ωστόσο, σε κάποιες χώρες της ΕΕ, που επιτρέπεται οι καταναλωτές να προμηθεύονται νωπό γάλα, είναι απαραίτητη η προϋπόθεση πως θα ακολουθήσει οικιακός βρασμός, για την εξάλειψη της πλειοψηφίας των κυριαρχούμενων μικροοργανισμών. (EFSA, 2015).

### 2.2.2. Σε αγελαδινό γάλα

Στο αγελαδινό γάλα, που είναι και το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο είδος, επικρατούν σε μεγάλες ποσότητες τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB), όπως τα *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc* και *Enterococcus spp.*, τα οποία είναι πιθανό να προέρχονται από την εντερική χλωρίδα και την πιθανή επαφή με μολυσμένα κόπρανα. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι όταν υπάρχουν χαμηλές θερμοκρασίες στις οποίες διατηρείται το νωπό γάλα, εμφανίζονται και τα ψυχρόφιλα *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και *Aeromonas* (Quigley et al., 2013). Επίσης, σε υψηλό ποσοστό στο συγκεκριμένο είδος έχει ανιχνευτεί και το παθογόνο *Coxiella burnetii*, το οποίο είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας του πυρετού Q (Khamesipour et al., 2018).

Τέλος, σύμφωνα με έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από την επιστημονική ομάδα του Willis και αργότερα, και από την ομάδα του McLauchlin, διαπιστώθηκε πως στο νωπό αγελαδινό γάλα η ανιχνεύσιμη ποσότητα του *Listeria monocytogenes*, ήταν μηδαμινή συγκριτικά με τα άλλα είδη γάλακτος. (Willis et al., 2018, McLauchlin et al., 2020, EFSA, 2021).

### 2.2.3. Σε αίγιο γάλα

Όσο για το αίγιο γάλα, το οποίο πλέον είναι το δεύτερο αντιπροσωπευτικό είδος γάλακτος που καταναλώνεται και πολλές φορές αντικαθιστά το αγελαδινό, είναι πλούσιο σε σίδηρο, και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μικρών λιποσφαιριδίων και υψηλού φορτίου λιπαρών οξέων και αποτελεί εξαιρετικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη LAB. Από την εν λόγω οικογένεια, τα σημαντικότερα βακτήρια είναι: *Lactococcus* (106 CFU/mL), *Lactobacillus* (105 CFU/mL), *Leuconostoc* (103 CFU/mL) και *Enterococcus* (102 CFU/ mL). Σε συχνότερη βάση απομονώνονται τα βακτηριακά γένη *Enterobacteriaceae* και *Micrococcaceae* (Alonso-Calleja et al., 2002). Τα μικροβιακά αυτά λοιπόν στοιχεία, έχει παρατηρηθεί ότι ποικίλλουν ανάλογα με την εποχή και τις καιρικές συνθήκες αλλά και τη διατροφή του ζώου, χωρίς βέβαια να υπάρχουν πολλές επιστημονικές μελέτες που το αποδεικνύουν. Εκτός λοιπόν από τους πληθυσμούς *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, και *Enterobacteriaceae spp.*, που συναντώνται σε όλα τα είδη γάλακτος, διαπιστώθηκε πως το χειμώνα κυριαρχούσαν τα είδη *Lactococcus spp.* και *Pseudomonas spp.*, το καλοκαίρι ανιχνευόταν κυρίως γένη του είδους *Klebsiella spp.*, και το φθινόπωρο κυριαρχούν τα είδη *Staphylococcus spp.*, *Acinetobacter baumannii* και *Corynebacteria*. (Callon et al., 2007).

Ωστόσο, τα παθογόνα που έχει παρατηρηθεί να μην εμφανίζονται στο αίγιο γάλα ανήκουν στα γένη *Salmonella spp.* και *Campylobacter spp.* (Verraes et al., 2014, EFSA,2021).

### 2.2.4. Σε πρόβιο γάλα

Το πρόβιο γάλα, σπάνια καταναλώνεται ευθέως. Πιο συχνά επιλέγονται τα προϊόντα ζύμωσής του. Επειδή η διατροφικές συνήθειες των προβάτων διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή, είναι αναμενόμενο διαφορετικά είδη προβάτων να φέρουν διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι έντονη, η συγκέντρωση των μεσόφιλων βακτηρίων ποικίλει μεταξύ 10<sup>2</sup> - 10<sup>6</sup> CFU/mL, και αυτή των ψυχρόφιλων μεταξύ 10<sup>2</sup> - 10<sup>4</sup> CFU/mL. Ακόμη, μελέτες έχουν αποδείξει ότι το υψηλότερο περιεχόμενο λίπους, οδηγεί και σε υψηλότερο περιεχόμενο LAB, κολοβακτηριδίων και μυκητών. Επιπλέον, οι *Streptococci* αυξάνονται σε γάλα με μειωμένη διατροφική αξία και υψηλής οξύτητας, ενώ, στο ίδιο περιβάλλον, ελαττώνεται ο πληθυσμός του *Staphylococcus aureus* (Tilocca et al., 2020). Σε σπάνιες περιπτώσεις, είναι πιθανό να εντοπιστούν τα παθογόνα γένη *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Brucella spp.*, *Yersinia enterocolitica* και *Campylocacter spp.* (Fotou et al., 2011, Verraes et al., 2014,EFSA,2021).

### 2.2.5. Σε βουβαλίσιο γάλα

Το βουβαλίσιο γάλα, ως φρέσκο προϊόν, έχει μικρή αγορά στις ευρωπαϊκές χώρες σε σύγκριση με το τυρί Buffalo Mozzarella που παράγεται. Καταναλώνεται κυρίως σε ανατολικές χώρες, όπως είναι η Ινδία και το Πακιστάν. Πρόσφατη έρευνα σχετικά με το νωπό γάλα βουβάλου έδειξε τα γένη *Lactococcus spp.* και *Acinetobacter spp.* ως τα κυρίαρχα βακτήρια, καθώς αντιπροσωπεύουν το 30% και το 21% της συνολικής σύνθεσης βακτηρίων, αντίστοιχα. Άλλα άφθονα είδη βακτηρίων περιλαμβάνουν το *Pseudomonas spp.* (20%), *Streptococcus macedonicus* (10%) και *Lactococcus lactis*

(10%). Ορισμένοι άλλοι, όχι τόσο άφθονοι μικροοργανισμοί, είναι οι *Brochothrix spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Chryseobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Gammaproteobacteria*, *Yersinia enterocolitica* και *Haloanella spp.* (Ercolini et al., 2012, Quigley et al., 2013).

#### 2.2.6. Σε γάλα καμήλας

Με την κατανάλωση του γάλακτος καμήλας, ενέχει υψηλό κίνδυνο της μετάδοσης της βρουκέλλωσης, από τον μικροοργανισμό *Brucella melitensis*, που παρατηρείται κυρίως σε αγροτικές περιοχές. Ακόμη, έχουν παρατηρηθεί και συμβάντα λιστερίωσης, από το *Listeria monocytogenes*. Άλλοι μικροοργανισμοί που έχουν ανιχνευτεί κατά καιρούς στο νωπό γάλα καμήλας είναι οι *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* και *Escherichia coli*, μαζί με τους *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sonorensis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.* και *Enterobacter spp.* (Khalesi et al., 2017). Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις έχουν ανιχνευθεί και ίχνη από προβιοτικούς γαλακτοβάκκλους (LAB) από τις κατηγορίες των *Lactobacillus fermentum* και *Lactobacillus plantarum*, οι οποίοι κατάφεραν να επιδείξουν αντιβακτηριδιακή δράση απέναντι *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium* και *Escherichia coli*, με αποτέλεσμα την πρότασή τους ως προσθέτων στα γαλακτοκομικά προϊόντα, για την ενίσχυση της ποιότητάς τους (Mahmoudi et al., 2016).

#### 2.2.7. Σε ονογάλα

Τέλος, λόγω της όχι και τόσο εκτεταμένης κατανάλωσης του ονογάλακτος, οι μελέτες που έχουν εκπονηθεί για αυτό είναι περιορισμένες. Παρόλα αυτά, το μικροβιακό φορτίο του δείχνει να είναι παρόμοιο με αυτό των υπόλοιπων τύπων γάλακτος. Έτσι, αποδεικνύεται ότι περιέχει γαλακτοβάκκλους, κολοβακτηρίδια και μύκητες. Από αυτά, τα μεσόφιλα εντοπίστηκαν σε πληθυσμούς του ύψους των  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>, και τα ψυχρόφιλα στα  $10^2$  CFU mL<sup>-1</sup> (Quigley et al., 2013). Στο συγκεκριμένο είδος δεν ανιχνεύτηκε καθόλου το παθογόνο *Salmonella spp.*, αλλά σε μια αξιολόγηση, που αφορούσε τη μικροβιολογική ασφάλεια του ονογάλακτος και η οποία πραγματοποιήθηκε στην Ιταλία, το 2018 από την επιστημονική ομάδα του Mottola, κατέδειξε πως τα παθογόνα *Campylobacter coli* και *E. coli O157* ανιχνεύθηκαν το καθένα στο 1% στα 90 διαθέσιμα δείγματα. (Mottola et al., 2018, EFSA, 2021).

#### 2.2.8 Βακτηριακοί δείκτες

Η παρουσία μεγάλου αριθμού βακτηριακών δεικτών, όπως είναι τα *Enterobacteriaceae*, στο παστεριωμένο γάλα αποδεικνύει πως είτε δεν έχει επιτευχθεί σωστή παστερίωση, είτε έχει συμβεί μόλυνση μετά την διαδικασία παστερίωσης. Οι μικροοργανισμοί αυτής της κατηγορίας είναι λογικό να υπάρχουν σε αφθονία στο νωπό γάλα, πρέπει όμως να

θανατώνονται με τις θερμικές επεξεργασίες. Έχουν αναπτυχθεί εργαστηριακές διαδικασίες ανίχνευσής τους και ταυτοποίησής τους εύκολες και γρήγορες, οι οποίες δίνουν αποτελέσματα εντός εικοσι τεσσάρων ή σαράντα οκτώ ωρών. Σύμφωνα με τον κανονισμό ΕΚ 2073/200511 , το επιτρεπτό όριο για κολοβακτηρίδια στο παστεριωμένο γάλα, ανέρχεται στα 10 CFU/ mL. (EFSA, 2021).

Ένας τρόπος επιβεβαίωσης και ταυτοποίησης των εντεροβακτηριοειδών είναι η χρήση του Maldi- tof MS, η οποία χρησιμοποιήθηκε και για την ταυτοποίηση των βακτηρίων στη συγκεκριμένη μελέτη.

Συγκεκριμένα, η μέθοδος MALDI TOF – MS, πρόκειται για ανάλυση φασματομετρίας μάζας, όπου ως πηγή ιονισμού χρησιμοποιείται το MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ιόντα από μεγάλα μόρια, με ελάχιστο κατακερματισμό. Σημαντικό είναι να τονιστεί πως τα μόρια δεν θραυματοποιούνται, αλλά ιονίζονται ήπια. Στη συνέχεια, και αφού το δείγμα έχει κρυσταλλωθεί στη μήτρα, ακτινοβολείται με ακτινοβολία UV, μιας δέσμης. Τα φωτόνια του λέιζερ, αλληλεπιδρούν με τα μόρια της μήτρας, με τα τελευταία να απορροφούν κβάντα ενέργειας, και να ενεργοποιούνται. Έτσι, η μήτρα εξαχνώνεται και συμπαρασύρει στην αέρια φάση τα μόρια του υπό μελέτη δείγματος. Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζονται ο TOF (Time of Flight, Χρόνος Πτήσης) των ιονισμένων μορίων, σε ηλεκτροστατικό πεδίο.

Η εν λόγω μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, ενώ χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη διάγνωση καρκίνων, κληρονομικών ασθενειών, αλλά και έτερων βιοδεικτών όπως πρωτεΐνες. Ακόμη, σημαντική είναι η συμβολή του για την αναγνώριση και ταυτοποίηση διαφόρων τύπων μικροβίων.

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX), μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης ως δείκτης μικροβιολογικής ποιότητας σε νωπό και παστεριωμένο γάλα. Σύμφωνα με μια ιταλική μελέτη που διεξήχθη από το IZSLT, το 2020, υπάρχει μια σχετικά μικρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών της OMX και της ALP για το αιγοπρόβειο και το βουβαλίσιο γάλα, μετά την βραδεία παστερίωση. ( IZSLT, 2020). Επειδή όμως και σε αυτή την περίπτωση μπορεί να συμβεί επαναμόλυνση μετά την παστερίωση, με αποτέλεσμα υψηλό ποσοστό OMX , που δεν σημαίνει κακή παστερίωση σε αυτή την περίπτωση, η μέτρηση της OMX, δεν αποτελεί καλή εναλλακτική λύση αντί της μέτρησης alp, για την παρακολούθηση μια επιτυχημένης παστερίωσης. (EFSA,2021).

## 2.3 Θερμική Επεξεργασία

Περιγράψαμε νωρίτερα ότι το γάλα αποτελεί ένα ιδιαίτερο υπόστρωμα για την ανάπτυξη πολλών παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, που μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στην υγεία του καταναλωτή ή και να υποβαθμίσουν ποιοτικά το τελικό προϊόν. Συνοψίζοντας, τα κυριότερα παθογόνα μικρόβια του γάλακτος είναι: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp., *Aeromonas Hydrophila*, *Brucella* spp., *Mycobacterium bovis* ή *tuberculosis*, Εντεροπαθογόνα και βεροτοξινογόνα στελέχη *E.coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, παθογόνοι στρεπτόκοκκοι και θειοαναγωγικά κλωστηρίδια.

Προκειμένου το γάλα να εξυγιανθεί , να ελαττωθεί η ποσότητα των παθογόνων μικροοργανισμών και να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα, ώστε να μπορεί να διατεθεί για ανθρώπινη κατανάλωση ή και για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, υπόκειται σε διάφορες διεργασίες. Οι επικρατέστερες και πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η βακτηριοκάθαρση και οι διάφορες θερμικές επεξεργασίες με επικρατέστερη την διαδικασία της παστερίωσης και ακολουθούν η θερμοποίηση, η υψηλή παστερίωση, η παρατεταμένη διάρκεια ζωής, η παστερίωση με UHT (ultra high temperature) και τέλος η αποστείρωση.

### **2.3.1 Θέρμανση –θερμοποίηση**

Η θέρμανση, που μπορεί να χαρακτηριστεί και ως υπο-παστερίωση, αποσκοπεί στη διατήρηση της ποιότητας του νωπού γάλακτος για κάποιο χρονικό διάστημα , στο οποίο απαιτείται να διατηρηθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες, πριν υποστεί τις περαιτέρω απαραίτητες επεξεργασίες. Η «υπο-παστερίωση» έχει στόχο τη μείωση των ψυχρόφιλων βακτηρίων. Αυτοί οι οργανισμοί παράγουν θερμικά σταθερά ένζυμα όπως λιπάσες και πρωτεϊνάσες σε χαμηλές θερμοκρασίες και είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η θέρμανση ή η παστερίωση στο γαλακτοκομικό αγρόκτημα μειώνει το χρόνο πολλαπλασιασμού των ψυχρόφιλων μικροοργανισμών και παραγωγής θερμικά σταθερού ενζύμου και, συνεπώς, μειώνει τους κινδύνους αλλοίωσης (Tamime, 2009). Το υπο-παστεριωμένο γάλα στη συνέχεια υφίσταται τις απαραίτητες θερμικές επεξεργασίες, ώστε να παστεριωθεί πλήρως και να μπορεί να καταναλωθεί ή υφίσταται τις απαραίτητες διαδικασίες ώστε να μετατραπεί σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η διαφορά του από το πλήρως παστεριωμένο γάλα είναι η ύπαρξη αλκαλικής φωσφατάσης.(Deeth et al., 2017, EFSA ,2021).

### **2.3.2. Βακτηριοκάθαρση**

Η βακτηριοκάθαρση αποτελεί ένα πρόσθετο χειρισμό για την απομάκρυνση μεγάλου μέρους των βακτηρίων με φυγοκέντρωση. Συγκεκριμένα, η αρχή λειτουργίας της βακτηριοκάθαρσης στηρίζεται στη διαφορά πυκνότητας των κυττάρων των βακτηρίων και των κυττάρων του ορού του γάλακτος. Με τη βοήθεια της κεντρομόλου δύναμης που αναπτύσσεται από την υψηλή ταχύτητα στην οποία τίθεται ο βακτηριοκαθαριστής, τα μεγάλα βακτηριακά κύτταρα εναποτίθενται στο τοίχωμα του βακτηριοκαθαριστή, απ' όπου και συλλέγονται κάθε 15-20 λεπτά. Στη συνέχεια, το καθαρισμένο γάλα εξέρχεται από το σύστημα του καθαριστή και προωθείται για παστερίωση. Η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα χωρίς να απαιτείται διαχωρισμός φάσεων, σε ένα κλειστό σύστημα, υπό αναερόβιες συνθήκες. Έτσι διασφαλίζεται και ο αποκλεισμός περαιτέρω επιμολύνσεων από τον αέρα (Stack & Sillen, 1998). Η εφαρμογή βακτηριοκάθαρσης πριν την παστερίωση απομακρύνει το 95-98% των βακτηρίων.



### 2.3.3. Παστερίωση

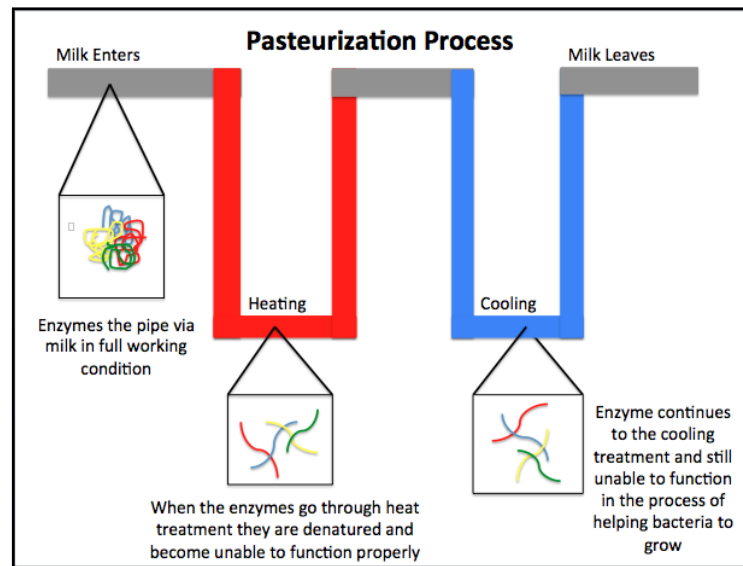
Η ασφάλεια και η ποιότητα των προϊόντων αυτών και η πιθανότητα ανάπτυξης μικροοργανισμών καθορίζονται από την ποιότητα του νωπού γάλακτος. Γενικότερα, το γάλα που προέρχεται από υγιή ζώα θεωρείται αποστειρωμένο από τους μαστικούς αδένες. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν πιθανότητες να εμφανιστούν μικρόβια και βακτήρια αμέσως μετά το άρμεγμα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο εξωτερικό μολυσμένο περιβάλλον, όπως χώμα, αέρας, μολυσμένο εργατικό προσωπικό ή ακόμα και από την απέκκριση γάλακτος από εξωτερικά μολυσμένους μαστικούς αδένες. (Angulo et al, 2009). Πηγή μόλυνσης μπορεί να αποτελέσει και ο εξοπλισμός, ή να συμβεί κατά τη διάρκεια μεταφοράς του γάλακτος στους χώρους επεξεργασίας του. (Millogo et al, 2010).

Για το λόγο αυτό, το νωπό γάλα υποβάλλεται σε προκαταρκτική θερμική επεξεργασία, όπως προαναφέρθηκε, ( $\pm 10$  s  $65^{\circ}\text{C}$ ) αμέσως μετά την άφιξή του στο εργοστάσιο επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων και πριν από την αποθήκευση σε σιλό.

Κατά την παστερίωση, το γάλα θερμαίνεται ήπια, συνήθως κάτω από τους  $100^{\circ}\text{C}$ , και για συγκεκριμένο μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να θανατωθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που ευδοκιμούν εκεί και προκαλούν αλλοίωση του προϊόντος. Σύμφωνα με τους Bylund και Deeth, η επίδραση στις φυσικές, χημικές, θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος είναι σχετικά μικρή και αμελητέα. (Bylund, 1995, Deeth, 2006, EFSA, 2021). Με αυτόν τον τρόπο, αυξάνεται και η διάρκεια ζωής του στο ράφι (shelf life). Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην απενεργοποίηση των ενζύμων και των μικροοργανισμών που απειλούν την ποιότητά του, καθώς και την υγεία του καταναλωτή. Είναι εξαιρετικά πιθανό να προκαλέσουν σοβαρές επιπλοκές στην υγεία του ανθρώπου, όπως κάποια τροφολοίμωξη. Μεταξύ των οργανισμών που στοχεύονται, είναι τα βλαστικά βακτήρια, αλλά όχι οι σπόροι τους. Στην περίπτωση της καταστροφής και των σπορίων, η διεργασία καλείται αποστείρωση (Tamime, 2009).

Στη βιομηχανία γάλακτος συναντώνται τρεις κύριοι τύποι παστερίωσης : Η βραδεία παστερίωση (Low-Temperature, Long-Time, LTLT) και η ταχεία παστερίωση (High-Temperature, Short-Time, HTST). Στην πρώτη περίπτωση, η θέρμανση του γάλακτος πραγματοποιείται στους  $62,5^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά. Στη δεύτερη περίπτωση, διαρκεί για μόλις 15 δευτερόλεπτα, και η απαιτούμενη θερμοκρασία είναι οι  $72^{\circ}\text{C}$ . Στην τρίτη κατηγορία, εφαρμόζεται οποιοσδήποτε άλλος συνδυασμός συνθηκών χρόνου-θερμοκρασίας για την επίτευξη ισοδύναμου αποτελέσματος, έτσι ώστε τα τρόφιμα να παρουσιάζουν αρνητική αντίδραση στην αλκαλική φωσφατάση αμέσως μετά τη θερμική επεξεργασία. Για την παστερίωση εξαιρετικά υψηλής θερμοκρασίας (Ultra High Temperature, UHT), θα πρέπει να υπάρχει ροή πολύ υψηλής θερμότητας για σύντομο χρονικό διάστημα (όχι χαμηλότερα από  $135^{\circ}\text{C}$ , για κατάλληλο χρονικό διάστημα), με σκοπό να δημιουργηθεί μη-βιώσιμο περιβάλλον για μικροοργανισμούς και σπόρια, και να μην μπορούν να αναπτυχθούν, ακόμη και όταν αποθηκευτεί το γάλα σε ασηπτική συσκευασία. Ειδικότερα, και προκειμένου να διασφαλιστεί η μικροβιολογική σταθερότητα του προϊόντος, το γάλα επωάζεται για 15 ημέρες στους  $30^{\circ}\text{C}$ , ή για 7 ημέρες στους  $55^{\circ}\text{C}$  (Ritota et al., 2017) . Ωστόσο, οι πραγματικές συνθήκες ενδέχεται

να ποικίλουν από χώρα σε χώρα. Επιπλέον, η παστερίωση προκαλεί κάποια αλλοίωση στο χρώμα, τη γεύση και την εμφάνιση του γάλακτος, ενώ δεν παρατηρείται υποβάθμιση της διατροφικής του αξίας. Τέλος, θα πρέπει τα παστεριωμένα προϊόντα να αντέχουν εκτός ψύξης για έως 48 ώρες, και έως αρκετές μέρες υπό ψύξη, ώστε να θεωρηθεί επιτυχημένη η διεργασία (Juffs & Deeth, 2007). Συνήθως η διάρκεια ζωής του καλά παστεριωμένου γάλακτος, ποικίλλει ανάλογα με τη χώρα προέλευσης και το είδος. (Deeth & Lewis, 2017, EFSA, 2021).



**Εικόνα 1:** Διαδικασία Παστερίωσης.

(Το γάλα ξεκινάει στα αριστερά και εισέρχεται στη σωληνώσεις με λειτουργικά ένζυμα τα οποία θα υποστούν θέρμανση, θα μετουσιωθούν και θα σταματήσει η λειτουργία τους. Αυτό βοηθά στη διακοπή της ανάπτυξης παθογόνων, διακόπτοντας τη λειτουργικότητα του κυττάρου. Η διαδικασία ψύξης βοηθά να σταματήσει το γάλα από την αντίδραση Maillard και την καραμελοποίηση. Η διαδικασία παστερίωσης έχει επίσης την ικανότητα να θερμαίνει τα κύτταρα στο σημείο που εκρήγνυνται από την αύξηση της πίεσης.)

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple\\_Pasteurization.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple_Pasteurization.png))

Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της παστερίωσης πραγματοποιείται μέσω ενός παγκοσμίως αποδεκτού και γρήγορου τεστ, τη λεγόμενη «Δοκιμή της Φωσφατάσης». Η δοκιμή της φωσφατάσης ουσιαστικά αφορά στον προσδιορισμό της δραστηρότητας του ενζύμου αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα. Παρακάτω θα αναλύσουμε εκτενέστερα την εν λόγω δοκιμή.

#### **2.3.4. Υψηλή παστερίωση**

Η μέθοδος υψηλής παστερίωσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασιακό εύρος μεταξύ 85 και 127 ° C για χρόνο 1- 4 δευτερόλεπτα. (Töpel ,2015).Βέβαια σύμφωνα με τους Deeth και Lewis, παρ'όλο που οι συνθήκες αυτές φαίνονται ιδανικές, διότι η δραστηριότητα των ενζύμων ALP και LPO εντοπίζεται στο ελάχιστο, δεν είναι καθορισμένες ακόμα. (Deeth & Lewis, 2017, EFSA,2021).

#### **2.3.5 Επεξεργασία γάλακτος εκτεταμένης διάρκειας ζωής (Extended Shelf-Life Milk)**

Το ESL μπορεί να παραχθεί με δύο βασικούς τρόπους. Ο πρώτος αναφέρεται στη θερμική επεξεργασία, με συνθήκες θερμοκρασίας που κυμαίνονται από 123- 145 ° C και για χρονικό διάστημα 1- 5 δευτερόλεπτα, ενώ ο δεύτερος τρόπος αναφέρεται σε μη θερμικές διεργασίες, όπως είναι η μικροδιήθηση, στην οποία συνήθως χρησιμοποιείται μια μεμβράνη με πόρους μεγέθους 0,8-1,4 και για καλύτερα αποτελέσματα συνδυάζεται συνήθως με τη θερμική επεξεργασία HTST. Το ESL φαίνεται να διατηρείται σε χαμηλές θερμοκρασίες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, συγκριτικά με το παστεριωμένο. (Deeth & Lewis, 2017, EFSA,2021).

#### **2.3.6. Αποστείρωση**

Το γάλα μπορεί επίσης να αποστειρωθεί, σε φιάλες ή δοχεία, ή να υποστεί επεξεργασία UHT, η οποία συνοδεύεται από ασηπτικές συνθήκες και ασηπτική συσκευασία. Τα αποστειρωμένα προϊόντα που προκύπτουν έχουν αρκετά μεγάλη διάρκεια ζωής στο ράφι, χωρίς να χρειάζεται η διατήρησή τους σε θερμοκρασίες ψύξης. Η αποστείρωση επιτυγχάνεται είτε σε θερμοκρασιακό εύρος 115-120 ° C για χρονικό διάστημα 20-30 λεπτά, είτε με θέρμανση στους 135-145 ° C για 2-5 δευτερόλεπτα. (EFSA, 2021). Με αυτές τις συνθήκες οδηγούνται σε θάνατο όλοι οι μικροοργανισμοί και απενεργοποιούνται σχεδόν όλα τα ένζυμα , με εξαίρεση κάποιες πρωτεάσες ή λιπάσες που προέρχονται από ψυχρόφιλα βακτήρια και είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε μείωση της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Η όλη διαδικασία της αποστείρωσης λαμβάνει χώρα σε κλειστό χώρο, ώστε να αποφευχθούν οι μολύνσεις του προϊόντος από εξωτερικούς μικροοργανισμούς. (Bylund, 1995, Deeth & Lewis, 2017, EFSA, 2021).



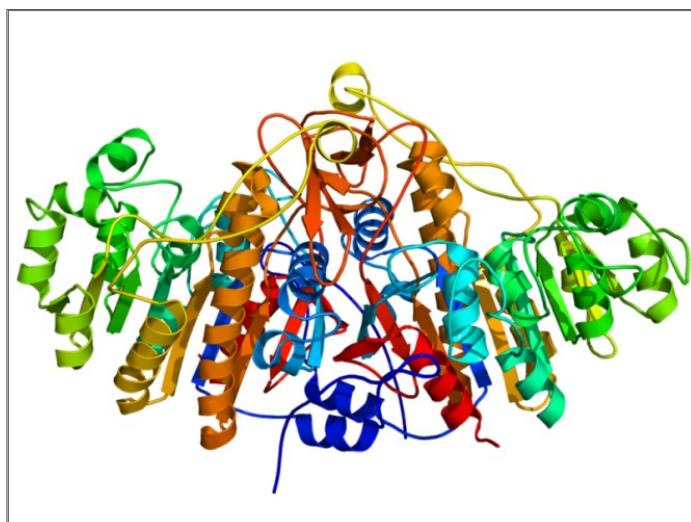
## 2.4 Αλκαλική Φωσφατάση

### 2.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Η αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase, ALP) πρόκειται για ένζυμο, και πιο συγκεκριμένα μια γλυκοπρωτεΐνη, που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από την επιστημονική ομάδα των Suzuki *et al.*, το 1907, και αποτελεί ένα από τα περισσότερα από εξήντα ενδογενή ένζυμα του νωπού αγελαδινού κυρίως γάλακτος (Schlimme *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 2016). Υπάρχει σε αφθονία στη φύση και κυρίως στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, όπως το συκώτι, τα οστά, το αίμα και τα νεφρά, αλλά συναντάται επίσης στο γάλα και στα σωματικά υγρά και άλλων οργανισμών. (Fleming *et al.*, 2003). Χρησιμοποιείται σε δοκιμασίες ελέγχου βιοχημικής παστερίωσης βιομηχανικών προϊόντων και αποτελεί δείκτη σωστής παστερίωσης, διότι είναι πιο ανθεκτική σε σχέση με άλλους παθογόνους οργανισμούς. Περιέχει σιαλικό οξύ και η αποτελεσματικότητά της είναι μεγαλύτερη στο αλκαλικό περιβάλλον. (McComb *et al.*, 1979). Η ενζυμική του δραστηριότητα σχετίζεται με την υδρόλυση των φωσφορικών μονοεστέρων και απελευθέρωση ανόργανων φωσφορικών αλάτων σε αλκαλικό pH, όπως υποδηλώνει και το όνομα που της αποδόθηκε. Η ALP διακρίνεται σε τέσσερα ισοένζυμα, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εκφράζονται. Έτσι, διακρίνουμε την εντερική ALP, την ALP του πλακούντα, την ALP των μικροβιακών κυττάρων, καθώς και την ALP μη-ειδικού ιστού, ή κοινώς την ALP ήπατος/οστού/νεφρού. Ειδικά η εντερική αλκαλική φωσφατάση υπάρχει σε αρκετά υψηλά επίπεδα στους εντερικούς ιστούς και αποτελεί ένα θερμοανθεκτικό και θερμο-σταθερό ένζυμο (Sharma *et al.*, 2014).

Η αλκαλική φωσφατάση των θηλαστικών, λοιπόν, είναι κυρίως εντερικής ή πλακουντιακής προέλευσης, και αυτό επειδή αυτά τα δύο όργανα είναι πλούσια σε ένζυμα. Ωστόσο έχουν μελετηθεί και άλλα όργανα, όπως ο εγκέφαλος, οι νεφροί, και το συκώτι, στα οποία η ποσότητα της αλκαλικής φωσφατάσης ήταν αμελητέα και οι ιδιότητές της διαφορετικές (Folley & Kay, 1936, Tang *et al.*, 2019).

Στη φύση συναντώνται τόσο σε προκαρυωτικούς, όσο και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, με μεγαλύτερη έμφαση στους τελευταίους. Ωστόσο, απέχουν από τα ανώτερα φυτά. Στα θηλαστικά, οι ALP χαρακτηρίζονται ως μεταλλοένζυμα που περιέχουν ψευδάργυρο, που κωδικοούνται από μια μεγάλη οικογένεια γονιδίων και λειτουργούν σε διμερή μορίων. Το ενεργό τους κέντρο σχηματίζεται από τρία μεταλλικά ιόντα: δυο ιόντα δισθενούς ψευδαργύρου ( $Zn^{+2}$ ) και ένα ιόν δισθενούς μαγνησίου ( $Mg^{+2}$ ). Ωστόσο, αυτά τα μεταλλικά ιόντα συμβάλλουν επίσης ουσιαστικά στη διαμόρφωση του μονομερούς ALP και ρυθμίζουν έμμεσα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων της (Hoylaerts *et al.*, 1997). Η δομή της αλκαλικής φωσφατάσης του *E. coli* δίνεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 2), και είναι η μοναδική δομή ALP που έχει διασαφηνιστεί. Ωστόσο, η ALP των θηλαστικών εμφανίζει ελάχιστη ομοιότητα με αυτήν (Bortolato *et al.*, 2002).



**Εικόνα 2:** Αλκαλική Φωσφατάση του *E. coli* (Kim & Wyckoff, 1991).

#### 2.4.2 Χαρακτηριστικά ALP στο γάλα

Συγκρίνοντας αλκαλικές φωσφατάσες διαφορετικής προέλευσης, αυτές που απαντώνται στο γάλα ανθρώπων, στο αγελαδινό και το πρόβειο έχουν παρόμοια μοριακή μάζα, θερμοανθεκτικότητα, βέλτιστο pH, σταθερά Michael Km και σταθερά ιονισμού pK. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τα διάφορα κλάσματα φωσφατάσης ανθρώπου ή προβατίνας διευκρινίζουν το πρόβλημα της ετερογένειας και δείχνουν ότι οι παραλλαγές ανθρώπου και προβάτου υψηλής μοριακής μάζας αποτελούνται από το ίδιο διμερές που έχει μάζα 160.000 έως 170.000 daltons. Ο γενετικός πολυμορφισμός του ενζύμου που εξάγεται από λίπος ενός μείγματος γάλακτος είναι αμφίβολος. Ακόμη, η δράση των διαφόρων μετάλλων, είτε στο ενεργό κέντρο, είτε στο ενεργοποιημένο κέντρο, στην ALP του εκάστοτε είδους, σε περίπτωση υποκατάστασης, φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Έτσι, το  $Mg^{2+}$  δεν μπορεί να αντικαταστήσει το  $Zn^{2+}$  στην περιοχή του λευκοχρύσου, ώστε να αποδώσει ένα ενεργό ένζυμο, ενώ αντίστοιχα, το  $Zn^{2+}$  στη θέση του  $Mg^{2+}$  δρα ανασταλτικά. Το  $Mn^{2+}$ , και ειδικότερα το  $Co^{2+}$ , θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν, ιδανικά, τόσο το  $Zn^{2+}$  όσο και το  $Mg^{2+}$  (Linden & Alais, 1978).

**Πίνακας II: Περίπτωση υποκατάστασης του μεταλλικού κέντρου στις περιοχές των  $Zn^{2+}$  και  $Mg^{2+}$ , σε ανθρώπινο, αγελαδινό και πρόβειο γάλα.**

$M^{2+}$	Περιοχή $Zn^{2+}$	Περιοχή $Mg^{2+}$
$Zn^{2+}$	+	-
$Mg^{2+}$	-	+
$Co^{2+}$	+	+
$Mn^{2+}$	+	+
$Ni^{2+}$	-	+
$Cu^{2+}$	-	-

Η ανάλυση της καθαρής ALP των βοοειδών, απέδειξε ότι το μοριακό της βάρος είναι ίσο με 187 kDa και ότι το ισοηλεκτρικό της σημείο βρίσκεται μεταξύ των περιοχών pH 5,4 – 6,0. Ακόμη, δρα με μέγιστη απόδοση σε pH 9,65 – 10,1, και σε θερμοκρασία 37 °C (Vega-Warner et al., 1999, Goltzman & Miao, 2004, Punoo, 2018). Η διαλυτότητά του σε λιπαρό διαλύτη είναι μηδαμινή, ενώ βρέθηκε στην ενδιάμεση επιφάνεια λιπιδίων – νερού στο γάλα. Η αλκαλική φωσφατάση σχετίζεται με τη μεμβράνη σφαιριδίων λίπους γάλακτος (Milk Fat Globule Membrane, MFGM) στο νωπό γάλα, η οποία μπορεί να ληφθεί υπόψη όταν τα συμπυκνωμένα ή κλασματοποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα, εμπλουτισμένα σε MFGM, παστεριώνονται. Επιπλέον, η φυλή στην οποία ανήκει κάθε αγελάδα, ο όγκος του γάλακτος που παράγεται, καθώς και το στάδιο της γαλουχίας στο οποίο βρίσκεται, μπορούν, ενδεχομένως, να επηρεάσουν τα επίπεδα συγκέντρωσης της ALP στο γάλα (Rankin et al., 2010).

Η παρουσία και η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα αποτελεί δείκτη για την αποτελεσματικότητα της επαρκούς παστερίωσης και εξαρτάται από το είδος του ζώου και τη φυλή του. Έχει καθιερωθεί σαν δείκτης παστερίωσης, διότι αποτελεί ένα από τα πιο ανθεκτικά ένζυμα τόσο στη θερμότητα, όσο και πιο σκληρές συνθήκες θερμοκρασίας – χρόνου, που έχουν χρησιμοποιηθεί για την απενεργοποίηση του *Mycobacterium avium*, το πιο θερμοσταθερο παθογόνο στο γάλα. (Farkye, 2021). Σε άλλες προηγούμενες μελέτες, έχει επίσης διαπιστωθεί η απενεργοποίηση των παθογόνων *Salmonella senftenberg* και *Listeria monocytogenes*. (Eckner, 1992). Τα θηλαστικά, στον οποίων το γάλα υπάρχει μεγάλο ποσοστό λιπαρών και λιποπρωτεϊνών, εμφανίζουν και μεγαλύτερη ποσότητα του ενζύμου. (Fox & Kelly, 2006). Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τους Vamvakaki et al., το 2006, βρέθηκε ότι η θερμική επεξεργασία στους 59 °C, για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, μείωσε τα επίπεδα της ALP στο γάλα των ζώων. Παρατηρήθηκε ότι η μείωση έγινε με πιο αργό ρυθμό στο γάλα αγελάδας, ακολούθησε το γάλα κατσίκας και πολύ πιο σύντομα απομακρύνθηκε από γάλα προβάτων. (Vamvakaki et al., 2006).

Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, διαπιστώθηκε πως το μεγαλύτερο ποσοστό της αλκαλικής φωσφατάσης υπήρχε στη βουτυρόκρεμα του γάλακτος και κατά την ανάδευση της κρέμας με σκοπό την παραγωγή γάλακτος, διαπερνούσε στο γάλα η μισή

ποσότητα από αυτή που πριν είχε παρατηρηθεί στην κρέμα γάλακτος. (Kay & Graham , 1933).

Συγκεκριμένα, στο γάλα αγελάδας, η αλκαλική φωσφατάση βρίσκεται σε ποσοστό 45% στην κρέμα και 55% περίπου στο αποβουτυρωμένο γάλα. Στην κρέμα, όπως προαναφέρθηκε, η ALP συγκεντρώνεται στην MFGM (Farkye, 2021, EFSA,2021). Επιπροσθέτως, η ομάδα του Levieux, απέδειξε πως η θερμική απενεργοποίηση της ALP ακολουθεί κινητική πρώτης τάξεως με το μεσαίο σημείο μετουσίωσής της για το γάλα να έχει ληφθεί στους 56 ° C για χρονικό διάστημα θέρμανσης 30 λεπτών.( Levieux et al., 2007).

Η κινητική θερμική απενεργοποίησης της alp στο νωπό και μη θερμικά επεξεργασμένο αγελαδινό γάλα εμφανίζει τιμές D60 από 19.47 , 23 , και 27.2 λεπτά και τιμές z από 4,9 και 6,7 (Andrews, 1992, Levieux, et al.,2007)., ενώ η αναμενόμενη τιμή z για το συγκεκριμένο ένζυμο στο νωπό ονόγαλα υπολογίζεται στους 5,31 °C. (Marchand et al.,2009).(EFSA,2021)

#### *2.4.3. Μικροβιακή Αλκαλική Φωσφατάση*

Η αλκαλική φωσφατάση παράγεται και από αρκετά βακτηριακά στελέχη και σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζει μεγαλύτερη αντοχή, από την ALP των βοοειδών, σε υψηλότερες θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης ψευδών θετικών αποτελεσμάτων, στη δοκιμή της φωσφατάσης. Μερικές από τις μέχρι σήμερα αναφορές υποδηλώνουν ότι ορισμένα βακτηριακά κύτταρα παράγουν ALP που είναι ασταθής στη θερμότητα, καθιστώντας δύσκολη τη διαφοροποίηση από την υπολειμματική ALP των βοοειδών (KNIGHT & FRYER, 1989, CAC, 2004, Punoo, 2018).

Οι αναλύσεις ρουτίνας δεν είναι ικανές να διακρίνουν άμεσα τους δύο τύπους φωσφατασών. Συνεπώς, ο Αμερικανικός Σύλλογος Δημόσιας Υγείας, προτείνει την επαναπαστερίωση οποιουδήποτε δείγματος θετικού στη δοκιμή της φωσφατάσης. Αν η δραστηριότητα της ALP δεν είναι εμφανώς μειωμένη μετά την επαναπαστερίωση, μπορούμε, πια, να συνάγουμε το συμπέρασμα ότι η ποσότητα της ALP που αναλύθηκε εξαρχής αφορούσε στη θερμοανθεκτική μικροβιακή φωσφατάση.

Μια ακόμη πρόταση για την επίτευξη του διαχωρισμού μεταξύ μικροβιακής και ζωικής ALP εκφράστηκε από τους (Murthy & Kaylor, 1990) , υποστήριξε την ηλεκτροφόρησή τους σε gel αгарόζης. Ο πληθυσμός των ψυχροτροφικών οργανισμών στο νωπό γάλα πριν από την παστερίωση, υπερβαίνει τα  $1,2 \times 10^7$  cfu/mL. Μαζί, είναι πιθανό να εμφανίσουν επαρκή μικροβιακή ALP για να προκαλέσουν θετικό τεστ ALP. Ωστόσο, οι τρέχουσες πρακτικές που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση μεταξύ τέτοιων δραστηριοτήτων βασίζονται στη χαρακτηριστική ατομική θερμοκρασία απενεργοποίησης της επανενεργοποιημένης και μικροβιακής ALP.

#### **2.4.4 Θερμική απενεργοποίηση ALP**

Κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας πρέπει να πληρούνται οι κατάλληλες και ανάλογες συνθήκες θερμοκρασίας/ χρόνου, ώστε να μην προκληθούν μη θεμιτά αποτελέσματα στο γάλα, π.χ αλλοίωση.( Blel et al., 2001).

Αρκετά πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, έχουν βασιστεί στη χρήση θερμοστατικού εργαστηριακού αντιδραστήρα, ο οποίος ήταν εξοπλισμένος με αναδευτήρα (135 περιστροφές ανά λεπτό συγκεκριμένα). Έπειτα σε κάποια πειράματα προστέθηκε το νωπό γάλα σε προθερμασμένο,απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς ενώ σε άλλα προστέθηκε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου ( $K_3PO_4$ ), με pH =6,6, που είναι ανάλογο με αυτό του νωπού γάλακτος. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η κατάλληλη θερμοκρασία και ανάλογο της θερμικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε ήταν και το χρονικό διάστημα. (Fadiloğlu et al., 2006). Έπειτα, σε τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν λήψη δείγματος, το οποίο τοποθετούνταν σε παγωμένο νερο αμέσως για να ψυχθεί, να σταματήσει η θερμική απενεργοποίηση και να μετρηθεί η δραστηριότητα της ALP. (Fadiloğlu et al., 2006, Marchand et al., 2009).

Η θερμική απενεργοποίηση της alp στο γάλα, περιγράφεται με ακρίβεια από ένα κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης, σε θερμοκρασίες μεταξύ 54 και 64 °C. (Ludikhuyze et al.,2000, Fadiloğlu et al., 2006, Marchand et al., 2009).

Βέβαια, παρ' όλο που η ALP χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης σωστής παστερίωσης, δεν υπάρχουν πολλές κινητικές μελέτες που να αναφέρονται στη θερμική απενεργοποίησή της στο νωπό γάλα. Ο Eckner (1992), ανέφερε τιμές D 6,04 λεπτά σε 63 °C και 0,35 λεπτά σε 71 °C ( Eckner ,1992), ενώ ο Mistry (1989), που ερεύνησε τη θερμική απενεργοποίηση της ALP σε αποβουτυρωμένο και καλά φιλτραρισμένο γάλα , ανέφερε τιμές D27,2 -22,5 λεπτά στους 60 °C και 8,3-7,6 λεπτά στους 63 °C. (Mistry, 1989, Ludikhuyze et al.,2000).

#### **2.4.5 Μη θερμική απενεργοποίηση ALP**

Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως απενεργοποίηση της ALP μπορεί να συμβεί και με χρήση υψηλής πίεσης, προκαλώντας διάτμηση ή κρούση, αλλά και με διεργασία με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Electric Field,PEF) , που απενεργοποιεί και τη μικροβιακή ALP. (Shamsi et al., 2008). Συγκεκριμένα στον πρώτο τρόπο η πίεση κυμαίνεται από 400 – 800 MPa σε θερμοκρασιακό εύρος 5-40 ° C.( Rademacher & Hinrichs, 2006, Rankin et al., 2010).

Η τεχνολογία PEF αποτελεί μια νέα σχετικά εναλλακτική μέθοδο μη θερμικής επεξεργασίας που έχει ως βάση τη χρήση μικρών ηλεκτρικών παλμών υψηλής τάσης για την απενεργοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών , στους οποίους οφείλεται η αλλοίωση των τροφίμων. (Barbosa-Cánovas et al., 1999). Κύριος στόχος αυτής της τεχνολογίας είναι η παραγωγή ασφαλέστερων τροφίμων, απαλλαγμένων από παθογόνα και με καλύτερα αποτελέσματα από εκείνα που δίνει η θερμική επεξεργασία, όπως η παστερίωση.( Bendicho et al., 2002).

Επίσης, όπως φαίνεται μέσω αυτής της νέας μεθόδου αποφεύγεται η αλλοίωση του χρώματος και της γεύσης, καθώς και η απώλεια των θρεπτικών συστατικών, που είναι συχνά φαινόμενα στις τεχνικές θερμικής επεξεργασίας. (Giner et al., 2000, Shamsi et al., 2008). Παρ' όλο που δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός απενεργοποίησης της αλφ από PEF, κάποιες επιστημονικές ομάδες συμπέραναν πως αυξάνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης των κυττάρων που είναι εκτεθειμένα στους ηλεκτρικούς παλμούς, προκαλώντας ηλεκτροδιάτρηση και μόλις φτάσει σε συγκεκριμένη τάση ο παλμός για αρκετή διάρκεια, προκαλείται κυτταρικός θάνατος. (Zimmermann, 1986, Schoenbach et al., 2000).

Βέβαια, η αποτελεσματικότητα της PEF τεχνολογίας, εξαρτάται από τα ένζυμα αλλά και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες χρησιμοποιείται, συμπεριλαμβανομένων της θερμοκρασίας, της έντασης ηλεκτρικού πεδίου, το χρονικό διάστημα διάρκειας του παλμού καθώς και τη συχνότητα παλμού. Γενικότερα, θεωρείται πως όσο υψηλότερη είναι η ένταση και η θερμοκρασία του ηλεκτρικού πεδίου, θα είναι ανάλογη και συνεπώς μεγαλύτερη και η μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου, στη δική μας περίπτωση, της ALP. (Shamsi et al., 2008). Επίσης, έχει βρεθεί πως τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια δεν είναι τόσο ανθεκτικά όσο τα θετικά. (Hülshager & Niemann, 1983).

#### ***2.4.6. Μέθοδοι Ανάλυσης – Ανίχνευσης ALP στο γάλα και τα προϊόντα του και περιориτισμοί των μεθόδων***

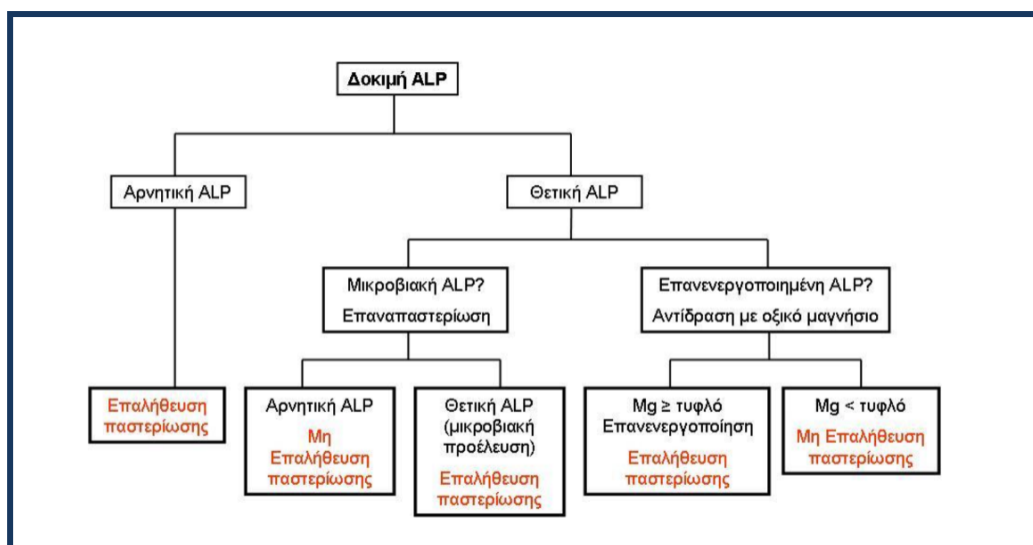
Μέσα στα χρόνια, προτάθηκαν αρκετές διαφορετικές μέθοδοι προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της παστερίωσης του γάλακτος. Μερικές από αυτές περιλάμβαναν τη χρήση δεικτών, όπως το μπλε του μεθυλενίου, ή και δοκιμές με βάση τα φαινοτικά, ενώ πολλές γαλακτοβιομηχανίες προβαίνουν σε μικροβιολογικούς ελέγχους, στα εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου (Mahato & Chandra, 2019). Ανάμεσα στους δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως, μεγαλύτερη προσοχή κέρδισε το μεταλλοένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), κυρίως για τη σταθερότητά της σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι έρευνες αποδεικνύουν ότι η ίδια καταστρέφεται σε θερμοκρασία περίπου ίδια με τη θερμοκρασία θανάτωσης των παθογόνων μικροοργανισμών (Rankin et al., 2010). Συνεπώς, το παστεριωμένο γάλα αναμένεται να στερείται της αλκαλικής φωσφατάσης. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι σε περιπτώσεις μαστίτιδας, η συγκέντρωση της ALP στο γάλα είναι εξαιρετικά αυξημένη (Babaei et al., 2007). Επομένως, η επεξεργασία αυτού του γάλακτος στη βιομηχανία απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή και για να γίνει αυτό, η ανίχνευση της ALP στο νωπό και παστεριωμένο γάλα έχει τεράστιο εμπορικό και υγειονομικό ενδιαφέρον. Λόγω αυτής της σημασίας της ALP στο γάλα, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ανίχνευση της ALP με διάφορες προσεγγίσεις.

Οι σημαντικότερες από τις εφαρμοζόμενες αναλυτικές τεχνικές, οι οποίες θα αναπτυχθούν και παρακάτω, αντιστοιχούν σε τέσσερις κατηγορίες: χρωματομετρικές, φθορισμομετρικές, τεχνικές χημειοφωταύγειας και οι ανοσοχημικές (Rankin et al., 2010, Punoo, 2018). Αν και οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται σταθερά και με σημαντική επιτυχία εδώ και αρκετά χρόνια, μόνο οι χρωματομετρικές, οι φθορισμομετρικές και οι τεχνικές χημειοφωταύγειας είναι αυτές που καθιερώθηκαν επίσημα, και σχετικά πρόσφατα, στη γαλακτοβιομηχανία (Rankin et al., 2010).



Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας αλκαλικής φωσφατάσης τόσο για νωπό γάλα, όσο και για γάλα θερμικώς κατεργασμένο, το πρότυπο της ISO αναφέρει ξεκάθαρα τη μέθοδο που θα πρέπει να εφαρμοστεί. Η μέθοδος αυτή «περιγράφει μια φθορισμομετρική μέθοδο για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP, EC 3.1.3.1) σε νωπό και θερμικώς κατεργασμένο πλήρες γάλα, ημι-αποβουτυρωμένο, αποβουτυρωμένο γάλα και γάλα με γεύσεις. Η μέθοδος αυτή δύναται να εφαρμοστεί σε γάλα και γαλακτοκομικά σκευάσματα αγελάδος, προβάτου και αίγας». Η δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται σε mU/L και μια μονάδα δραστικότητας αλκαλικής φωσφατάσης, ισοδυναμεί με την ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος ανά λεπτό. Η αναλυτική ικανότητα της μεθόδου έχει ανώτατο όριο τις 7000 mU/L, διαφορετικά απαιτείται αραίωση του δείγματος. Για να θεωρηθεί αρνητική η δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης, η τιμή που λαμβάνεται δε θα πρέπει να ξεπερνά τα 350 mU/L (Ritota et al., 2017).

Η Αρχή Λειτουργίας της δοκιμής της Φωσφατάσης στηρίζεται στην επανενεργοποίησή της, κατά την ανεπαρκή παστερίωση του νωπού γάλακτος. Ακόμη, κάτι τέτοιο είναι πιθανό να προκύψει από κάποια επιμόλυνση κατά την επεξεργασία του γάλακτος μετά την παστερίωση. Αυτό αποδίδεται, κυρίως, σε εσφαλμένη διαχείριση από τον υπεύθυνο ή στην επισφαλή κατάσταση του εξοπλισμού, που δεν υποβλήθηκε στην κατάλληλη διαδικασία συντήρησης. (Harding, 1991, Harding & Garry, 2005).



**Εικόνα 3.** Γενική λογική για τον προσδιορισμό της κατάστασης παστερίωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων που δοκιμάστηκαν με τον προσδιορισμό αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). (Rankin et al., 2010)

#### 2.4.6.1 Χρωματομετρικές Τεχνικές

Για την μέτρηση της δραστικότητας της ALP έχουν αναπτυχθεί αρκετές χρωματομετρικές τεχνικές (colorimetric techniques). Οι περισσότερες από αυτές βασίζονται στην ύπαρξη φαινόλης και τη δημιουργία έντονου χρώματος.

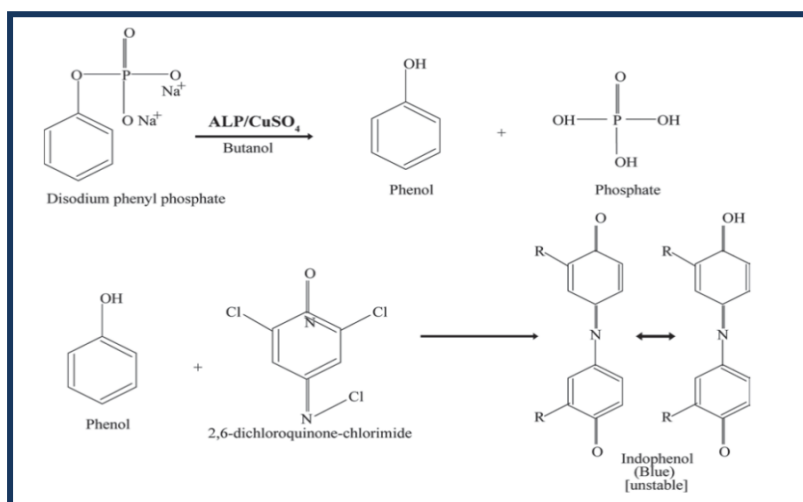
Η πιο διαδεδομένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη ποσοτική επιβεβαιωτική μέθοδος αυτής της κατηγορίας είναι η δοκιμή Scharer, η οποία είναι οπτική μέθοδος, είναι αξιόπιστη και δίνει γρήγορα αποτελέσματα. Κατά τη διαδικασία αυτή, προστίθεται στο δείγμα ένα φαινυλο-φωσφορικό υπόστρωμα (π.χ. disodium phenyl phosphate). Πιο αναλυτικά, μια φωσφορική ομάδα αυτού του υποστρώματος διασπάται από το ένζυμο ALP και απελευθερώνεται μια φαινόλη, η οποία στη συνέχεια εκχυλίζεται μαζί με βουτανόλη και αντιδρά με 2,6 – διχλωροκινόννη-χλωριμίδιο, σχηματίζοντας έτσι μια ινδοφαινόλη, που παρουσιάζει την ανάπτυξη του μπλε χρώματος. Όσο πιο μπλε είναι το χρώμα που δημιουργείται, τόσο μεγαλύτερη είναι η δραστηριότητα της ALP στο δείγμα γάλακτος. Αντιθέτως, όταν έχει επιτευχθεί σωστή παστερίωση και συνεπώς η δραστηριότητα της ALP στο γάλα είναι μικρότερη, δημιουργείται ένα γκρι έως καφέ χρώμα στο δείγμα. Η ένταση του χρώματος παρατηρείται είτε οπτικά, σε σύγκριση με δείγματα προτύπων, είτε με τη χρήση φασματοφωτόμετρων (Scharer, 1938, Rankin et al., 2010). Μέχρι πρόσφατα, τροποποιημένες εκδόσεις αυτής της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν στις ΗΠΑ ως μέθοδοι αναφοράς, όπως η ταχεία δοκιμή φωσφατάσης Scharer. Σύμφωνα με τη νομοθεσία εκείνη την εποχή, το γάλα έγινε αποδεκτό ως σωστά παστεριωμένο εάν η δραστικότητα της ALP ήταν ισοδύναμη με 1  $\mu\text{g}$  φαινόλης/mL δείγματος (που ισοδυναμεί με μόλυνση περίπου 0,1% σε νωπό γάλα, γεγονός που το καθιστά αποδεκτό) (Payne & Wilbey, 2009, Lakra et al., 2016).

Βέβαια και σε αυτή την περίπτωση απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, διότι υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στην εφαρμογή. Συγκεκριμένα, έμφαση δίνεται στα γυάλινα υλικά που χρησιμοποιούνται και στον σωστό καθαρισμό τους. Είναι πιθανό εάν γίνουν λάθος χειρισμοί να απελευθερωθεί φαινόλη από τα σκεύη και να αυξηθεί το ποσοστό της ψευδώς, δίνοντας λανθασμένα αποτελέσματα. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με άλλες αρωματικές ουσίες από τα σκεύη και τα υλικά που χρησιμοποιούνται. (Scharer, 1943).

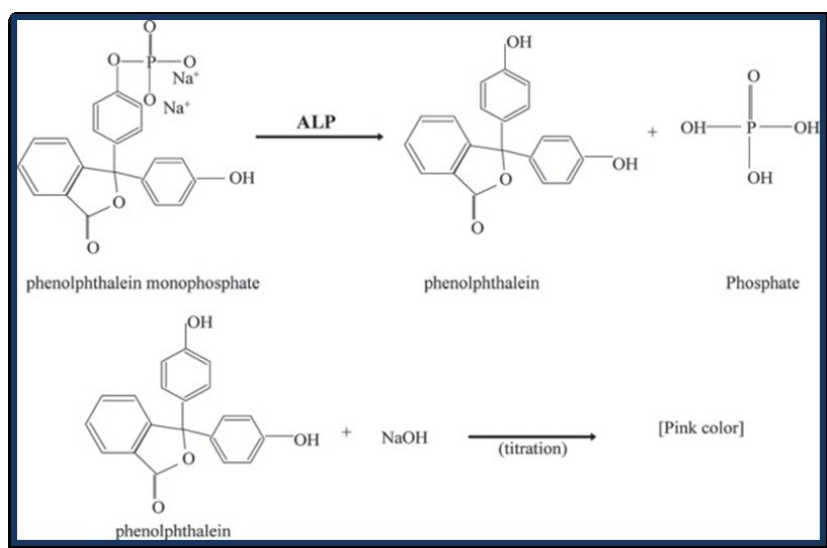
Η μέθοδος Scharer (εικόνα 4), διαθέτει αρκετές αδυναμίες, ωστόσο αποτελεί μια ευρέως αποδεκτή αναλυτική τεχνική. Πρώτον, φαινόλες μπορούν να προκύψουν στο δείγμα έπειτα από επιμόλυνση από ατελώς καθαρισμένο υαλικό εξοπλισμό, ή από πρόσθετες ενώσεις, όπως η βανιλίνη. Για την επίλυση του ζητήματος, προτάθηκαν οδηγίες για τον κατάλληλο καθαρισμό και επιλογή των υαλικών (Rocco, 2004). Δεύτερον, τα απαραίτητα αντιδραστήρια, καθώς και το σχηματιζόμενο φαινολικό χρωμοφόρο, είναι ασταθή με την πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα αυξημένο ρυθμό ψευδών αρνητικών Scharer. Αν και γρήγορη, φθηνή και βολική, η γρήγορη δοκιμή φωσφατάσης του Scharer βασίζεται σε υποκειμενικές οπτικές εκτιμήσεις της ανάπτυξης χρώματος και είναι ιδιαίτερα αναξιόπιστη κοντά στο όριο ανίχνευσης ή με το χρωματιστό προϊόν. Μια πιο αντικειμενική μέθοδος, βασισμένη σε φασματοφωτομετρικές μετρήσεις, έχει προταθεί για την επιβεβαίωση θετικών δειγμάτων και έχει αναφερθεί ότι είναι ικανή να ανιχνεύσει περίπου 0,1 έως 0,2% μόλυνση από νωπό γάλα στο παστεριωμένο γάλα (Angelino et al., 1999).



Η δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης του Rutgers, χρησιμοποιεί τη βουτανόλη για την εξαγωγή της απελευθερωμένης φαινόλης πριν από τη δημιουργία χρώματος. Η δοκιμή Scharer συχνά οδηγεί στο σχηματισμό ενός γαλακτώματος και μειώνει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Για την μείωση αυτού του σφάλματος, οι Babson και Greeley χρησιμοποίησαν τη μονοφωσφορική φαινολφθαλεΐνη ως υπόστρωμα. Καθώς το ALP απελευθερώνει φαινολφθαλεΐνη, η συγκέντρωση προσδιορίζεται κατόπιν με τιτλοδότηση με υδροξείδιο του νατρίου. Σε αντίθεση με τα αντιδραστήρια Scharer, η φαινολφθαλεΐνη σε μονοφωσφορικό υπόστρωμα και το προϊόν υδρόλυσης αυτής είναι πολύ σταθερή με την πάροδο του χρόνου και οι συνθήκες αποθήκευσης είναι χαρακτηριστικές για αυτόν τον προσδιορισμό (Babson & Greeley, 1967, Rankin et al., 2010).

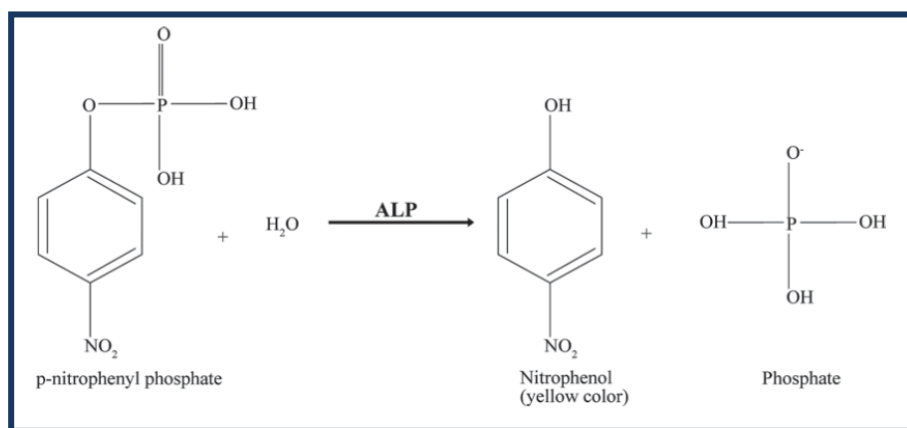


**Εικόνα 4.** Οι χημικές αντιδράσεις που περιγράφουν την Μέθοδο Scharer για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της ALP (Scharer, 1943).



**Εικόνα 5.** Οι χημικές αντιδράσεις που περιγράφουν την Μέθοδο Rutgers για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της ALP. (Rankin et al., 2010)

Η διαδικασία Aschaffenburg και Mullen (A&M), χρησιμοποιεί το αυτό-ενδεικτικό υπόστρωμα p-νιτροφαινυλοφωσφορικό με την επακόλουθη απελευθέρωση p-νιτροφαινόλης, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στο Ηνωμένο Βασίλειο. Όπως και με άλλες αντιδράσεις που προκαλούνται από ένζυμα, η δραστηριότητα ποικίλλει ανάλογα με το υπόστρωμα και η ισοδύναμη τιμή για τη μέθοδο A&M ήταν 10  $\mu\text{g}$  pNP/mL δείγματος (Payne & Wilbey, 2009). Έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι ανάλυσης για ALP, οι οποίες είναι ταχύτερες και πιο ευαίσθητες. Το Fluorophos, είναι μια ποσοτική φθορισμομετρική τεχνική, που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τον ορθοφωσφορικό μονοεστέρα βενζοθειαζολίου, ο οποίος απελευθερώνει ένα φθορίζον προϊόν το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί οργανικά σε 3 λεπτά (Rocco, 1990). Το πιο πρόσφατο νόμιμο όριο ανίχνευσης της ALP κυμαίνεται στα 350 mU/ L , σε σχέση με τα 500 mU/ L που ήταν παλιότερα, και ο επόμενος στόχος του ορίου είναι να κυμαίνεται στα 100 mU/ L. (Harding & Garry, 2005).



**Εικόνα 6.** Οι χημικές αντιδράσεις που περιγράφουν την Μέθοδο Aschaffenburg και Mullen για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό της ALP (Rankin et al., 2010)

Επιπρόσθετα, στον Καναδά συναντάται και η Επίσημη Καναδική Μέθοδος MFO-3 (Official Canadian Method, MFO-3). Αν και οι χρωματομετρικές μέθοδοι ακολουθούν παγκοσμίως κοινή μεθοδολογία, όπως ορίζει και η Διεθνής Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων (International Dairy Federation, IDF), στην MFO-3 γίνεται χρήση διαφορετικών αντιδραστηρίων και διαδικασιών για τον προσδιορισμό της ALP. Η προκείμενη μέθοδος, στηρίζεται στην ανίχνευση των φαινολικών που προκύπτουν από τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης στο φωσφορικό φαινύλιο. Η ποσότητα των φαινολικών που απελευθερώνονται (σε μικρογραμμάρια) στη μονάδα χρόνου (1 ώρα) χρησιμοποιείται αναλογικά, για να καθοριστεί η δραστηριότητα της ALP στο αρχικό δείγμα (Klotz et al., 2008).

#### 2.4.6.2. Ανοσοχημικές Τεχνικές

Με τον Ενζυματικό Ανοσοπροσροφητικό Προσδιορισμό (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), υπάρχει η δυνατότητα ανάλυσης ποσοτικών οργανικών ενώσεων σε ένα δείγμα. Η τεχνολογία αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και

εκλεκτικότητα. Ακόμη, κάνοντας χρήση της αντιγονικής φύσης της αλκαλικής φωσφατάσης, καθίσταται πλέον δυνατός ο διαχωρισμός των φωσφατάσων που εμπεριέχονται στο δείγμα του γάλακτος, σε γαλακτική και μικροβιακή προέλευσης ALP. Κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό με τις υπόλοιπες αναλυτικές τεχνικές. Σύμφωνα με τους Vega- Warner et al., το 2000, που πρώτοι ανέπτυξαν αυτή τη θεωρία, η υψηλή δραστικότητα της ALP, μπορεί να αποτελεί ένδειξη ανεπαρκούς παστερίωσης, ή ένδειξη επιμόλυνσης του παστεριωμένου γάλακτος από νωπό γάλα, ή στοιχείο για τη δράση μικροβίων που έχουν μολύνει το παστεριωμένο γάλα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην υψηλότερη σταθερότητα που επιδεικνύει η μικροβιακή φωσφατάση στην έντονη θερμική κατεργασία, σε σύγκριση με την ALP του γάλακτος. Σε έναν τυπικό έλεγχο δείγματος γάλακτος, που έχει διαγνωστεί θετικό για τη δραστικότητα της ALP, επαναπαστεριώνεται στο εργαστήριο και ελέγχεται εκ νέου για τη δραστικότητα της ALP. Σε περίπτωση που βρεθεί και πάλι θετικό, η μετρούμενη δραστικότητα αλκαλικής φωσφατάσης αποδίδεται σε μικροβιακές πηγές (Marshall, 1992).

Ένας ανοσολογικός προσδιορισμός ειδικός για το βόειο γάλα ALP μπορεί να παρέχει μια μέθοδο για τη διαφοροποίηση της ALP ζωικής προέλευσης, από τη μικροβιακή ALP. Έπειτα από τον επιτυχή καθαρισμό και την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων (PAb) έναντι καθαρισμένου ALP, ακολουθεί η ανοσοαποτύπωση (Western Blot). Όπως φαίνεται από την ανάλυση Western blot, τα PAbs αντέδρασαν διασταυρωμένα με ALP βόειου γάλακτος και ALP πλακούντα, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε το ίδιο με την ALP από εντερικό βλεννογόνο μοσχαριού ή βοοειδούς, ή με το *Escherichia coli*, ή με άλλες πρωτεΐνες του γάλακτος. Ο γενικός στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αναπτυχθεί μια ανοσοπροσροφητική δοκιμασία που βασίζεται σε ένζυμο PAb (ELISA) για να ανιχνεύσει την ALP του γάλακτος, να προσδιορίσει την ειδικότητα των PAbs που χρησιμοποιούνται στο ELISA έναντι του ALP από διάφορες πηγές, πρωτεΐνες γάλακτος και γλυκοπρωτεΐνες, αξιολογώντας την ανταγωνιστικότητά του. Έτσι ξεκίνησε και η αξιολόγηση της καταλληλότητας του συστήματος ELISA, για την ποσοτικοποίηση τόσο της φυσικής, όσο και της μετουσιωμένης με θερμότητα, ALP. (Vega- Warner et al., 2000).

Βασίζόμενοι στην αντιγονική φύση της ALP, οι Vega- Warner et al., 2000, παρουσίασαν την ικανότητα του Ενζυματικού Ανοσοπροσροφητικού Προσδιορισμού μέσω ανταγωνιστικού εμμέσου (CI ELISA), με σκοπό το διαχωρισμό της ALP ζωικής και μικροβιακής προέλευσης. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε για σχετικά απλά συστήματα, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εφαρμοστεί κατάλληλα σε περισσότερα σύνθετα συστήματα, όπως τα τρόφιμα, και ειδικότερα το γάλα. Η τεχνολογία CI-ELISA χρησιμοποιεί αντισώματα ειδικά για την αλκαλική φωσφατάση βόειου γάλακτος. Με τη λήψη μιας ανοσοσφαιρίνης, ειδικής για το βόειο γάλα (BM-ALP), η CI-ELISA αποδείχθηκε αποτελεσματική στη διαφοροποίηση μεταξύ BM-ALP και την ALP του βακτηρίου *E. Coli*. Ακόμη, ήταν δυνατή και η ποσοτικοποίηση του BM-ALP, σε αυτές τις συνθήκες (Chen et al., 2006).

Ακόμη μια τεχνική που περιλαμβάνει την ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων, αυτή τη φορά, αναπτύχθηκε από τους Geneix et al, το 2007. Η εν λόγω μέθοδος αναφέρθηκε ως η πρώτη ανοσοχημική μέθοδος ικανή να ανιχνεύσει νωπό γάλα, σε μείγμα νωπού και θερμικώς επεξεργασμένου γάλακτος, σε ποσοστό αραίωσης έως και 0.02%. Σε αντίθεση με την τεχνική CI-ELISA που αναπτύχθηκε παραπάνω, εδώ δεν απαιτείται καθαρισμένη ALP. Ακόμη, με αυτή τη μέθοδο καθίσταται δυνατή και η μελέτη της κινητικής της

εξουδετέρωσης της ALP σε βόειο γάλα, σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 50 έως 60 °C και σε χρόνο 5 έως 60 λεπτών. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν, μπορούν εύκολα να συσχετιστούν με τα αποτελέσματα των χρωματομετρικών αναλύσεων, αποδεικνύοντας έτσι την εγκυρότητά τους.

Αν και δεν έχει εγκριθεί προς το παρόν για χρήση από ρυθμιστικούς οργανισμούς, η ανάπτυξη ανοσολογικής ανάλυσης θα μπορούσε ενδεχομένως να μειώσει τα ποσοστά σφάλματος που προκύπτουν από τις δυσκολίες που εμφανίζουν οι τρέχουσες τεχνολογίες στη διαφοροποίηση μεταξύ μικροβιακών, υπολειμματικών και επανενεργοποιημένων ιχνών αλκαλικής φωσφατάσης. Εκτός από τη συμπερίληψη πειραματικών μαρτύρων, όπως γίνεται σε οποιαδήποτε ανάλυση ALP, η ικανότητα μιας ανοσοχημικής δοκιμασίας να διαφοροποιείται μεταξύ υπολειμματικών (φυσικών), θερμικά μετουσιωμένων (ανενεργών) και επανενεργοποιημένων (ανακατασκευασμένων) ALP, απαιτεί το μόριο ALP να εκδηλώνει αρκετά διαφορετικούς αντιγονικούς καθοριστικούς παράγοντες ή τομείς. Παρόλο που η μέθοδος ELISA έχει αποδειχθεί ικανή να διαφοροποιείται μεταξύ της φυσικής και της μετουσιωμένης ALP, λείπουν αναφορές επιτυχούς διαφοροποίησης μεταξύ της φυσικής και της επανενεργοποιημένης ALP. Μία τέτοια εξέλιξη θα απαιτούσε το μετουσιωμένο μόριο ALP να επανεμφανιστεί σε διαφορετική κατάσταση διαμόρφωσης από το φυσικό μόριο. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει εγκεκριμένη ανοσοχημική δοκιμασία για την τακτική αξιολόγηση της δραστηριότητας ALP σε γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα (Rankin et al., 2010).

#### **2.4.6.3. Φθορισμομετρικές Τεχνικές και Τεχνικές Χημειοφωταύγειας**

Οι αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται στην ιδιότητα των μορίων να φθορίζουν χρησιμοποιούνται εκτενώς στις επιστήμες της χημείας και της βιολογίας, ειδικά στις ενζυμικές αναλύσεις, όπου η υψηλή ευαισθησία είναι απαραίτητη, για τη λήψη σωστού αποτελέσματος. Μια από τις πρώτες φθορισμομετρικές τεχνικές που δημοσιεύτηκαν, αφορούσαν στον προσδιορισμό της βόειας αλκαλικής φωσφατάσης, από τους Fernley & Walker (Fernley & Walker, 1965). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην απελευθέρωση μιας φωσφορικής ρίζας, έπειτα από την επίδραση της φωσφατάσης σε κάποιο υπόστρωμα όπως το 4-Methylumbelliferyl phosphate, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μια έντονα φθορίζουσα ένωση, την 7-υδροξυ-4-μεθυλ-κουμαρίνη (ή 4-methylumbelliferone). Το προϊόν αυτό εμφανίζει μέγιστη ταινία φθορισμού σε pH = 14. (Yoshitomi, 2004 Rola & Sosnowski, 2010). Για την ίδια αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα και ένα μονο-φωσφορυλιωμένο βενζοθειαζολιακό παράγωγο. Πλέον, για την αλκαλική φωσφατάση στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα χρησιμοποιείται ένας φθορισμογόνος αρωματικός ορθοφωσφορικός εστέρας (Fluoro-phos, Advanced Instruments Inc., Needham Heights, MA) (Rankin et al., 2010).

Στον προκείμενο προσδιορισμό, μια φθορίζουσα ένωση, το “fluoroyellow”, παράγεται από την υδρόλυση του φθορίζοντος υποστρώματος και αναλύεται σε ειδικό φθορισμόμετρο. Η μέτρηση του φθορισμού που παράγεται με την πάροδο του χρόνου, σχετίζεται με την ενζυματική δραστηριότητα ή τη συγκέντρωση της ALP. Αυτή η συγκεκριμένη φθορισμομετρική ανάλυση είναι πολύ πιο γρήγορη (διαρκεί περίπου 3 λεπτά), απλή και περίπου 100 έως 1.000 φορές πιο ευαίσθητη από τις αντίστοιχες

χρωματομετρικές αναλύσεις, όπως η μέθοδος Scharer (Fox & Kelly, 2006). Ως αποτέλεσμα, αυτός ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός είναι αρκετά ευαίσθητος για να ανιχνεύσει ακόμη και μικρές ανωμαλίες κατά την επεξεργασία του γάλακτος. (Rankin et al., 2010).

Ένας εναλλακτικός φθορισμομετρικός προσδιορισμός έχει αναφερθεί από τους Fenoll et al., το 2002, και στοχεύει στη μέτρηση της δραστηριότητας της υπολειπόμενης αλκαλικής φωσφατάσης, σε μια ποικιλία ρευστών και στερεών γαλακτοκομικών προϊόντων. Η αρχή μεθόδου ακολουθεί την υδρόλυση ενός μη φθορίζοντος υποστρώματος, της φωσφορικής τριφθορομεθυλ-β-ουμπελλιφερόνης (trifluoromethyl-β-umbelliferone), σε ένα έντονα φθορίζον φαινολικό προϊόν. Ο προσδιορισμός λαμβάνει χώρα σε ένα ανάστροφο μικκυλιακό μέσο, το οποίο έχει συντεθεί από ανάμιξη ρυθμιστικών διαλυμάτων (2-amino-2-methyl-1-propanol buffer, pH 9.0, and borate buffer, pH 9.0), σε dioctyl sodium sulfosuccinate/isooctane, σε θερμοκρασία 38 °C. Η συνολική διάρκεια του πειράματος αγγίζει τα 450 δευτερόλεπτα, ενώ τα όρια ανίχνευσης είναι 0.04, 0.4 και 0.22% (vol/vol) για το νωπό γάλα, το πλήρες γάλα, το σοκολατούχο γάλα και το βούτυρο, αντίστοιχα (Fenoll et al., 2002).

Η ευαισθησία, η γραμμικότητα και η επαναληψιμότητα ενός φθορισμογόνου συστήματος (Fluorophos) έχει συγκριθεί με τις χρωματομετρικές μεθόδους των Aschaffenburg και Mullen και Scharer, σε δοκιμές της αλκαλικής φωσφατάσης σε παστεριωμένο γάλα, στο οποίο έχει προστεθεί νωπό γάλα, ή καθαρισμένη βόεια αλκαλική φωσφατάση, ή δείγματα γάλακτος που έχουν υποστεί διαφορετικές θερμικές κατεργασίες. Η μέθοδος Fluorophos έχει αναφερθεί ότι χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια και επαναληψτικότητα, ενώ είναι γρηγορότερη και απλούστερη στην διεξαγωγή της, ειδικά σε σύγκριση με τις χρωματομετρικές τεχνικές (Payne & Wilbey, 2009).

Αρχικά, το ανώτατο επιτρεπτό όριο δραστηριότητας της ALP από τη μέθοδο Fluorophos καθορίστηκε στα 500 mU / L, και κυμαινόταν σε παρόμοια όρια με αυτά που είχαν καθοριστεί για τις χρωματομετρικές μεθόδους. Όμως, η μεγάλη ευαισθησία που παρουσίαζε η συγκεκριμένη μέθοδος, εμφανίζοντας όριο ανίχνευσης σε ποσοστό 0,003% της μόλυνσης σε νωπό γάλα, οδήγησε στη μείωση του επιτρεπτού ορίου ALP στο παστεριωμένο γάλα από 500 σε 350 mU / L. (Micciche, 2005).

Όσον αφορά την τεχνική χημειοφωταύγειας, αυτή αποτελεί τη βάση για ακόμη μια προσέγγιση στη μέτρηση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης. Οι προσδιορισμοί χημειοφωταύγειας βασίζονται στην αποφωσφορυλίωση των υποστρωμάτων αδαμαντυλικής 1,2-διοξετάνης, καταλυόμενης από την αλκαλική φωσφατάση. Αυτή η ομάδα υποστρωμάτων αναγνωρίζεται ειδικά από το ενεργό κέντρο το ενζύμου, και κόβεται από αυτό, αποδίδοντας ένα ενδιάμεσο φαινοξειδίου. Η αποδόμηση του φαινοξειδίου εκπέμπει παρατεταμένα φως, το οποίο μπορεί να αναγνωστεί με ένα φωταυγείομετρο (luminometer) ή με μια ψυκτική συσκευή μέτρησης φωτονίων. Η μεθοδολογία αυτή, προκειμένου να εφαρμοστεί, απαιτεί έναν απλό προσδιορισμό ενός αντιδραστήριου, με όριο ανίχνευσης το 1 zmol (603 μόρια) του ενζύμου (Kricka, 2003).

Το 1994, η επιστημονική ομάδα του Girotti, (Girotti et al., 1994) ανέπτυξε έναν προσδιορισμό, βασισμένο στις αρχές της χημειοφωταύγειας, με ευαισθησία και χρόνο

απόκρισης παρόμοια με τις αντίστοιχες παραμέτρους στις φθορισμομετρικές αναλύσεις. Μέσω αυτής της τεχνολογίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση της αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα. Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά που εξήχθησαν ποιοτικά και ποσοτικά από τη φασματοσκοπία απορρόφησης για την ALP. Σημαντικό χαρακτηριστικό για τον προσδιορισμό της χημειοφωταύγειας αποτελεί το γεγονός ότι δεν απαιτείται η παρασκευή διαλυμάτων στο εργαστήριο, ούτε και προετοιμασία του δείγματος για την ποσοτική ανάλυση που πρόκειται να διεξαχθεί. Μια δοκιμασία χημειοφωταύγειας (Palsite, Charm Sciences Inc., Lawrence, MA) εξετάστηκε και εγκρίθηκε από τον FDA / NCIMS και το Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης / Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων (ISO 22160 / IDF 209) και είναι, μαζί με το φθορισμομετρικό τεστ, μια από τις δύο τεχνολογίες που αναφέρονται συγκεκριμένα στο PMO 2009 ως αποδεκτές για δοκιμές ALP σε γαλακτοκομικά προϊόντα βαθμού A (Rankin et al., 2010, EFSA , 2021).

Επιπρόσθετα, πλέον έχουν εγκριθεί και ταχείες αναλύσεις χημειοφωταύγειας από τον NCIMS, το 2009. Αναφέρεται ως Γρήγορη Δοκιμή της Αλκαλικής Φωσφατάσης (Fast Alkaline Phosphatase test) (Charm Sciences Inc., Lawrence, MA). Το όριο ανίχνευσης της εν λόγω δοκιμής υπολογίζεται στα 20 mU/L της δραστηρότητας τη ALP, σε γάλα που έχει υποστεί HTST. Αυτή η ταχεία ανάλυση απαιτεί ελάχιστο όγκο και προετοιμασία του δείγματος, ενώ αναφέρεται ότι έχει χρόνο απόκρισης 45 δευτερόλεπτα (Rankin et al., 2010). Σε αυτή τη δοκιμή χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ένας φωσφορικός διοξατανικός φαινυλεστερας, ο οποίος δημιουργεί ένα ασταθές προϊόν που παράγει ανιχνεύσιμο φωτισμό ( Girotti et al.,1994).

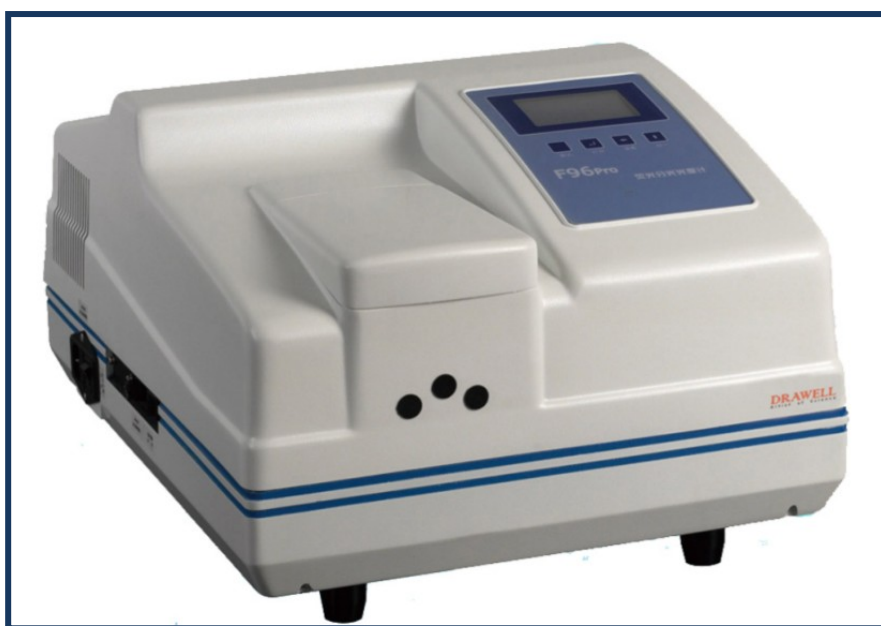
Συγκριτικά λοιπόν, και σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της AFFSA, στο Παρίσι, διαπιστώθηκε πως η μέθοδος Charm έδωσε 50% υψηλότερα και ακριβέστερα αποτελέσματα σχετικά με τη μέθοδο Fluorophos( Harding ,2007).

Το 2006, εκπονήθηκε μια έρευνα από τους Salter και Fitchen ,που αφορούσε στον προσδιορισμό με χημειοφωταύγεια της δραστηρότητας της ALP, όχι μόνο σε αγελαδινό γάλα, αλλά και σε γίδινο, πρόβειο και βουβαλίσιο γάλα. Ακόμη, στην έρευνα συμπεριλήφθηκαν δείγματα σοκολατούχο γάλα 2% λιπαρά, κρέμα 20% σε λιπαρά και αποβουτυρωμένο γάλα αγελάδος. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, τα νωπά γάλατα αγελάδας, αίγας και βουβάλου, θερμάνθηκαν στους 95 °C για 5 min, με σκοπό να παραχθεί γάλα, ελεύθερο αλκαλικής φωσφατάσης. Ακόμη, το πρόβειο γάλα παρέμεινε στους 63 °C για 40 λεπτά, ώστε να απαλλαχθεί από την ALP, χωρίς την κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Τέλος, τα δείγματα γάλακτος ψύχθηκαν στους 4 °C, ενώ έγινε και προσθήκη αντιβιοτικών, που λειτουργούν σαν συντηρητικά. Επίσης, τα πόσιμα γαλακτοκομικά προϊόντα αποχύθηκαν και εμβολιάστηκαν με διάφορες ποσότητες από νωπό γάλα, ανάλογα με το είδος του γάλακτος, ώστε να παράξουν ποσότητα ALP. Τα ίδια, στη συνέχεια, υπέστησαν θερμική κατεργασία για 5 λεπτά στους 95 °C, για την απενεργοποίηση της ALP (UHT). Τα δείγματα παρέμειναν υπό ψύξη, μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρέχουν χρήσιμες εφαρμοσμένες πληροφορίες, που θα μπορούσαν να ενσωματωθούν στο πρότυπο ISO-22160/IDF-209 για τον προσδιορισμό ALP χρησιμοποιώντας τη μέθοδο χημειοφωταύγειας EPAS. (Salter & Fitchen ,2006).

Στις μεθόδους προσδιορισμού EPAS, ακολουθείται η αρχή της δράσης του ενζύμου έναντι ενός φωτοενεργοποιημένου υποστρώματος. Η αλκαλική φωσφατάση, λοιπόν,

υδρολύει τα οργανοφωσφορικά από το υπόστρωμα και παράγει το φωτοενεργοποιημένο προϊόν, το οποίο και ανιχνεύεται από τα όργανα. Οι μέθοδοι αυτοί, μπορούν να εφαρμοστούν σε υποστρώματα είτε στη φθορισμομετρία, είτε στη χημειοφωταύγεια, τα οποία σβήνουν σταδιακά από ένα ομοιοπολικό συνδεδεμένο οργανοφωσφορικό μόριο. Μονάδες μέτρησης είναι τα miliunits του ενζύμου ανά λίτρο γάλακτος (mU/L). Κάθε millunit εκφράζει την ποσότητα του ενζύμου που καταλύει 1 ng του ειδικού υποστρώματος που υδρολύεται ανά λίτρο του διαλύματος και ανά λεπτό (Albillos et al., 2011). Η εγκυρότητα τόσο των χρωματομετρικών όσο και των φθορισμομετρικών δοκιμών (EPAS) για το αγελαδινό, το αίγαιο και το πρόβειο γάλα αξιολογήθηκε πρόσφατα με βελτιωμένη ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα χρησιμοποιώντας την αρχή του EPAS. Διεξήχθη μελέτη της κινητικής που εμπλέκεται στην μετουσίωση της αλκαλικής φωσφατάσης και προτάθηκε μια εναλλακτική μέθοδος για τη διασφάλιση της σωστής παστερίωσης που χρησιμοποιεί μια ανοσοδοκιμασία, η οποία είναι ακριβή και απαιτεί εξειδικευμένη εκπαίδευση (Albillos et al., 2011).

Τόσο οι μέθοδοι EPAS φθορισμού όσο και χημειοφωταύγειας έχουν παρόμοιες τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας σε αναλύσεις πλήρους γάλακτος πολλαπλών ειδών που ισχύουν για χαμηλότερα επίπεδα κατωφλίου ALP για τη δημόσια ασφάλεια που έχουν υιοθετηθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, και προτείνονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Επιπρόσθετα χαμηλότερα όρια ελέγχου είναι εφικτά στα 50 και 100 mU / L (Salter & Fitchen ,2006).



**Εικόνα 7.** Φθορισμόμετρο (high accuracy fluorometer, DRAWELL)  
( [https://drawell-lab.en.alibaba.com/product/60336338656-801043208/DRAWELL\\_BRAND\\_Lab\\_Fluorescence\\_Spectrophotometer\\_F96\\_PRO.html](https://drawell-lab.en.alibaba.com/product/60336338656-801043208/DRAWELL_BRAND_Lab_Fluorescence_Spectrophotometer_F96_PRO.html) )





**Εικόνα 8.** Αναλυτής Χημειοφωταύγειας (Fully automatic Chemiluminescence (CLIA) analyzer – Sri Medi Tech).  
( <https://www.indiamart.com/proddetail/chemiluminescence-analyzer-21293764348.html> )

#### *2.4.7. Παράγοντες που επηρεάζουν την παρουσία της ALP στο γάλα*

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς και έχουν δείξει πως η παρουσία της ALP στο γάλα και τα προϊόντα του εξαρτάται σε ένα μεγάλο βαθμό από τη σύνθεσή του και συνεπώς και από το είδος που προέρχεται. Το γάλα με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιπαρά φαίνεται να συνεπάγεται και μεγαλύτερη υπολειμματική δράση του ενζύμου ALP (Painter & Bradley, 1997). Όσο μεγαλύτερη είναι λοιπόν η περιεκτικότητα λίπους, τόσο αυξημένη είναι και η δραστηριότητα της ALP. Πιο συγκεκριμένα, το πλήρες γάλα παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα της ALP συγκριτικά με το αποβουτυρωμένο, διότι το ένζυμο παρουσιάζει την τάση να συσσωρεύεται στην βουτυρόκρεμα του γάλακτος. (Claeys et al., 2002). Αντίστοιχα, η δράση του ενζύμου επηρεάζεται και από το είδος του ζώου. Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος θηλαστικών, με τη σειρά από το είδος με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα προς τη μικρότερη και επομένως από την μεγαλύτερη υπολειμματική δράση ALP προς τη μικρότερη. Σημαντική είναι και η παστερίωση η οποία μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητα του ενζύμου στο μισό. (Rankin et al., 2010).



**Πίνακας III: Ποσοστό % λιποπεριεκτικότητας σε θηλαστικά**

Είδος θηλαστικού	% Λίπους
Βουβάλι	6,8-9,2
Πρόβατο	7,2-7,8
Κατσίκια	4,2-5
Καμήλα	3-4
Αγελάδα	3,5-3,8
Γαϊδούρα	0,9

( MacGibbon & Taylor, 2006).

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τη δραστηριότητα της ALP έχει παρατηρηθεί ότι είναι οι διάφορες ουσίες που προστίθενται είτε απευθείας στο γάλα, είτε περνούν έμμεσα από το ζώο στο γάλα. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα χρωστικά γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γάλα με γεύση φράουλα, που προστίθεται για προσδώσει έναν περισσότερο ελκυστικό χαρακτήρα στο προϊόν. Τέτοιου είδους προσθήκες, εγκυμονούν προκλήσεις κυρίως για τους χρωματομετρικούς προσδιορισμούς που εφαρμόζονται στην ανάλυση των γαλακτοκομικών προϊόντων. Στην ίδια κατηγορία κατατάσσονται και τα μη-χρωστικά πρόσθετα, όπως η βανιλίνη. Η βανιλίνη διαθέτει μια αρκετά δραστική φαινολική ομάδα, όταν οξειδώνεται σε βανιλικό οξύ. Άλλα τέτοια πρόσθετα είναι το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το σαλικυλικό οξύ. Οι εν λόγω ενώσεις μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το υπόστρωμα, στο οποίο στηρίζονται οι αναλυτικές τεχνικές της αλκαλικής φωσφατάσης, με συνέπεια να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Murthy et al., 1992).

Στη δεύτερη κατηγορία κατατάσσονται τα κατάλοιπα των κτηνιατρικών φαρμάκων, αντιβιοτικών και ορμονών που χορηγούνται στα ζώα αλλά και τα κατάλοιπα των φυτοφαρμάκων που εισέρχονται μέσω τροφής στο ζώο και στη συνέχεια περνούν και στο γάλα. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Manolkidis et al., όσον αφορά τα αντιβιοτικά, έχει βρεθεί ότι η πενικιλίνη και η οξυτετρακυκλίνη δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα στους χρωματομετρικούς προσδιορισμούς (Manolkidis et al., 1971).

Όμοιες παρατηρήσεις έχουν εξαχθεί και από τη μελέτη της επίδρασης των φυτοφαρμάκων. Ειδικότερα αυτών που περιέχουν πολυχλωριωμένα διφαινύλια, εξαιτίας της έντονης δραστηριότητάς της φαινολικής ομάδας (Kumar et al., 1973).

Βέβαια από πειραματικές διαδικασίες έχουν διαπιστωθεί τα εξής: τα φλαβονοειδή, οι σακχαρίτες, το ασκορβικό οξύ, καθώς και κάποιες πολυφαινόλες που ανιχνεύονται στο

κακάο, ασκούν ανασταλτική δράση στην ALP. Όπως επίσης και το χλωριούχο νάτριο έχει βρεθεί πως ελαττώνει τη σταθερότητα της ALP. Αντίθετα, η αυξημένη συγκέντρωση λακτόζης αυξάνει τη θερμική σταθερότητα της ALP ( Rankin et al., 2010).

Όσον αφορά στις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον της αλκαλικής φωσφατάσης, το ένζυμο τείνει να υφίσταται ανεπανόρθωτη καταστροφή της δραστηριότητάς του, σε όξινο pH, που αγγίζει τις συνθήκες καλλιέργειας του γάλακτος και του γιαουρτιού (Murthy et al., 1992). Ακόμη, έχει αποδειχθεί , από μελέτη που διεξήχθη από τους Ma et al., το 2001, ότι η χρήση του διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>), κυρίως ως συντηρητικού για την επέκταση του χρόνου αποθήκευσης (shelf life) του προϊόντος, δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τη δράση της ALP. Ωστόσο, συνίσταται η χρήση των κατάλληλων δειγμάτων ελέγχου (control samples), θετικών και αρνητικών (positive, negative), για τις ουσίες που φαίνεται να αλληλεπιδρούν, ειδικά σε τόσο εκλεπτυσμένα τρόφιμα ( Rankin et al., 2010).

#### ***2.4.8. Επανενεργοποίηση της Αλκαλικής Φωσφατάσης***

Ο προσδιορισμός της αλκαλικής φωσφατάσης, με τις αναλυτικές τεχνικές που αναπτύχθηκαν και παραπάνω, θεωρείται ενδεικτικός της παστερίωσης του γάλακτος, και απαιτεί την απενεργοποίηση του ενζύμου. Ωστόσο, ένα κοινό πρόβλημα που συναντάται, αποτελεί το ενδεχόμενο της επανενεργοποίησής του. Οι Wright και Tramer το 1956 (Wright & Tramer, 1956), ήταν οι πρώτοι που παρατήρησαν το φαινόμενο της επανενεργοποίησης της φωσφατάσης. Στις αναφορές τους κατέγραψαν ότι το παστεριωμένο γάλα, μπορεί και πάλι να διαγνωστεί θετικό στη δοκιμή της φωσφατάσης, σε περιπτώσεις που συντηρούνταν σε θερμοκρασίες μεταξύ 22 – 37 °C, ακόμη και αν είχαν βρεθεί αρνητικά, σε προηγούμενη ανάλυση φωσφατάσης. Ακόμη και κρέμα που έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία 74 °C, και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία άνω των 30 °C, έδειξε επίσης δείγματα επανεμφάνισης της ALP (Lyster & Aschaffenburg, 1962).(EFSA,2021).

Έχει αναφερθεί ότι η διαδικασία επανενεργοποίησης είναι επικείμενη στο γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία τύπου UHT όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι Deeth και Lewis συγκεκριμένα παρατήρησαν την επανενεργοποίηση της ALP σε θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα με UHT. Ενώ στο μόλις επεξεργασμένο γάλα ο έλεγχος για ALP ήταν αρνητικός, σε προϊόντα τα οποία είχαν αποθηκευτεί , ο έλεγχος για ALP έδωσε θετικά αποτελέσματα. (Deeth and Lewis,2017).Μάλιστα , η ευνοϊκότερη θερμοκρασία αποθήκευσης που προκαλεί επανενεργοποίηση μετά από 6 περίπου ώρες είναι 30 °C, και είναι δυνατόν να συνεχίζεται εως και μια εβδομάδα αργότερα. ( Fox & Kelly, 2006).

Αργότερα, η επιστημονική ομάδα του Murthy (Murthy et al., 1976) απέδειξε μέσα από σειρά πειραμάτων, ότι ο μέγιστος βαθμός επανενεργοποίησης της ALP επιτυγχάνεται όταν το γάλα θερμαίνεται στους 104.4 °C, στη συνέχεια επωάζεται στους 34 °C, και προσαρμόζεται σε pH 6.5. Διαπίστωσαν επίσης ότι το νωπό γάλα που υποβλήθηκε σε ταχεία θέρμανση πάνω από τους 85 ° C είναι πιο ευαίσθητο σε «επανενεργοποίηση ή μετουσίωση» του ενζύμου ALP. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες, δεν κατάφεραν να συσχετίσουν την επανενεργοποίηση, το χρόνο και τη θερμοκρασία παστερίωσης, καθώς

και τις συνθήκες αποθήκευσης του γάλακτος μεταξύ τους. Αντ' αυτού προτάθηκε ότι η τάση επανενεργοποίησης ποικίλει στο γάλα χωρίς ειδική σχέση με την περιεκτικότητα σε λιπαρά, ασκορβικό οξύ ή σε μεταλλικά ιόντα (Wright & Tramer, 1956) . Το συμπέρασμα, λοιπόν, που θα μπορούσε να εξαχθεί είναι ότι το γάλα που παστεριώνεται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τους 71,7 °C, είναι περισσότερο επιρρεπές σε επανενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης (Rankin et al., 2010).

Όσον αφορά στη συμβολή των μεταλλικών ιόντων στην επανεμφάνιση της αλκαλικής φωσφατάσης έπεται από την αδρανοποίησή της, έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες. Από τα μέταλλα που εξετάστηκαν, αυτά που φαίνεται να ασκούν τη μεγαλύτερη επίδραση στο εν λόγω φαινόμενο είναι το δισθενές κατιόν Μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ), το δισθενές κατιόν ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) και το δισθενές κατιόν ψευδαργύρου ( $Zn^{2+}$ ). Εν αντιθέσει, τα κατιόντα  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  και  $Sn^{2+}$ , καθώς και το EDTA, φαίνεται να δρουν ανασταλτικά απέναντι στην ALP (Sharma & Ganguli, 1974, Linden et al., 1977, Murthy & Peeler, 1979). (EFSA, 2021).

Ωστόσο, η προκειμένη δράση τους φέρεται να συσχετίζεται άμεσα με τη διαθεσιμότητα των ελεύθερων ιόντων  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$ , τις συνθήκες αποθήκευσης, το pH του περιβάλλοντος, καθώς και με τη διαθεσιμότητα φωσφορικών (Rankin et al., 2010). Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία των κατιόντων αυτών δεν ήταν αναγκαία και απαραίτητη κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, αλλά μόνο κατά τη διάρκεια της επώασης. (Richardson et al., 1964).

Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ενεργοποίηση του  $Mg^{2+}$ , έχει βρεθεί πως κυρίως η ALP του αγελαδινού και του πρόβειου γάλακτος διεγείρονται έντονα από την παρουσία μαγνησίου. Όσο περισσότερο εξαλείφεται το ένζυμο, τόσο μεγαλύτερο είναι το ερέθισμα, οδηγώντας στην επανενεργοποίηση. (Linden & Alais, 1978).

Έχει παρατηρηθεί πως η ομογενοποίηση πριν από τη θερμική επεξεργασία, ελαττώνει τον ρυθμό επανενεργοποίησης του ενζύμου. Σε μετέπειτα μελέτη, οι Painter και Bradley (Painter & Bradley, 1997) διαπίστωσαν ότι το γάλα με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά είναι ελαφρώς λιγότερο ευαίσθητο στην συζητούμενη επανενεργοποίηση. Μια άλλη μελέτη, που διεξήχθη από τους Gallusser and Bergner, έδειξε ότι ο ρυθμός επανενεργοποίησης του ALP έχει αντίστροφη σχέση με το περιεχόμενο οξυγόνου. (Gallusser and Bergner, 1981). Παρομοίως, το γάλα που παστεριώνεται με UHT και με αυξημένο διαθέσιμο οξυγόνο φαίνεται να παρουσιάζει μικρότερο βαθμό επανενεργοποίησης. Έχει προταθεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, οι ελεύθερες σουλφυδρυλ-ομάδες που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας, οξειδώνονται αργότερα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, και όσο αυξάνεται η θερμοκρασία στη διάρκεια αποθήκευσης, αναστέλλοντας έτσι τις αντιδράσεις διασταυρούμενων συνδέσεων σουλφυδρυλίου, που είναι κρίσιμες για την δραστηριότητα της ALP, μιας και είναι εξαρτώμενη από τη δομή της (Rankin et al., 2010).

#### ***2.4.9. Διαχωρισμός ανάμεσα στην Υπολειμματική και την Επανενεργοποιημένη Αλκαλική Φωσφατάση***

Τα αναλυτικά βήματα που ακολουθούνται προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο τύποι φωσφατάσης, δηλαδή η υπολειμματική και η επανενεργοποιημένη, στηρίζονται στην προϋπόθεση ότι η ALP θα επανενεργοποιηθεί σε περιβάλλον πλούσιο σε άλατα μαγνησίου. Η δραστηρότητά της αυξάνεται κατά 4 έως και 10 φορές. (Richardson et al., 1964). Σε μια τέτοια περίπτωση, το τελικό παστεριωμένο προϊόν μπορεί να δώσει μια ψευδώς θετική ανάλυση ALP. Κάθε φορά που υπάρχει υποψία ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω επανενεργοποίησης της ALP, ο αναλυτής πρέπει να προχωρήσει σύμφωνα με τις ακόλουθες εκτιμήσεις:

1. Το εν λόγω γάλα διαιρείται σε 2 επιμέρους δείγματα, και το πρώτο κατεργάζεται με διάλυμα οξικού μαγνησίου για να προκύψει η επανενεργοποίηση της ALP.
2. Και τα δύο δείγματα επωάζονται στους 34 °C για 60 λεπτά.
3. Το δείγμα αραιώνεται έξι φορές.
4. Στη συνέχεια, το δείγμα προσδιορίζεται ως προς τη δραστηρότητα της ALP.

Εάν οι μετρήσεις δείγματος που έχουν υποστεί την επίδραση του μαγνησίου είναι ίσες ή υψηλότερες από το δείγμα ελέγχου, η αρχική ανάλυση ALP θεωρείται ως αποτέλεσμα της επανενεργοποιημένης ALP. Αντιστρόφως, εάν το δείγμα που έχει υποστεί αγωγή με μαγνήσιο εμφανίζει περισσότερο ήπια δραστηρότητα από τον μάρτυρα, οι τιμές θεωρείται ότι προκύπτουν από την υπολειμματική ALP. Η αποκρυπτογράφηση της διαφοράς μεταξύ της υπολειπόμενης και της επανενεργοποιημένης ALP μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα τόσο για το εργοστάσιο, όσο και για το προσωπικό που είναι υπεύθυνο. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να περιπλέκεται περαιτέρω με την παρουσία μικροβιακής ALP (Rankin et al., 2010).

#### ***2.4.10. Αλκαλική Φωσφατάση σε Μη-Αγελαδινά Γαλακτοκομικά Προϊόντα***

Αν και η σημαντική πλειοψηφία των ερευνών που αφορούν στην αλκαλική φωσφατάση έχουν διενεργηθεί πάνω στα αγελαδινά γαλακτοκομικά προϊόντα, η συνεισφορά που έχει πραγματοποιηθεί και στα γαλακτοκομικά προϊόντα έτερης προέλευσης, δεν είναι ασήμαντη. Παρόλο που τα εν λόγω γαλακτοκομικά τρόφιμα παραμένουν σχετικά αδύναμα στην αγορά, μιας και η ποσότητα και η ποικιλία στην οποία παράγονται δεν μπορεί να ανταγωνιστεί τα αγελαδινά προϊόντα, παραμένει η ανάγκη να επικυρωθεί η παστερίωση των μη αγελαδινών γαλακτοκομικών προϊόντων και να κατανοηθεί η σχετική δραστηρότητα της ALP. Πολλοί ρυθμιστικοί και βιομηχανικοί οργανισμοί αναγνωρίζουν τη χρησιμότητα των δοκιμών ALP για το μη αγελαδινό γάλα, βάσει, πάντα, του ιστορικού απόδοσης τέτοιων προσδιορισμών, και όχι ενός ουσιαστικού ερευνητικού ιδρύματος. Περιορισμένη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμη για την παροχή τέτοιων θεμελιωδών δεδομένων για την εφαρμογή δοκιμών ALP στα συγκεκριμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η ανάπτυξη της αγοράς για τέτοια ειδικά τρόφιμα που περιέχουν γάλα κατσίκας, προβάτου ή βουβάλου μπορεί να αυξήσει την ερευνητική προσοχή σε αυτόν τον τομέα. (Rankin et al., 2010).

### *Αιγοπρόβριο γάλα*

Σε γενικές γραμμές, το αίγιο γάλα εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα δραστηριότητας όσον αφορά στην αλκαλική φωσφατάση του, εν συγκρίσει με τη αντίστοιχη του αγελαδινού γάλακτος (Williams, 1986). Αντίθετα, στο πρόβριο γάλα, η ALP φέρεται περισσότερο δραστική, δύο έως και τρεις φορές περισσότερο από το αγελαδινό γάλα, ενώ αυξάνεται κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, από τα 8.000 στα 17.000  $\mu\text{g}$  φαινόλης ανά mL (Klotz et al., 2008). Σύμφωνα με τους Raynal-Ljutovaca et al. (Raynal-Ljutovaca et al., 2007), υπήρχαν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο ALP μεταξύ ειδών, φυλής εντός ειδών και μεμονωμένων ζώων. Τα εύρη των συγκεντρώσεων ALP στο γάλα των αιγών, των προβάτων και των αγελάδων που βρέθηκαν, ήταν από 115 έως 1.300 για τις αίγες, 8.300 έως 17.300 για τα πρόβατα και 1.800 έως 4.750  $\mu\text{g}$  φαινόλης / mL για τις αγελάδες, και δεν σχετίζονται με την περιεκτικότητα σε λιπαρά των δειγμάτων γάλακτος. Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, διαπιστώθηκε πως το μεγαλύτερο ποσοστό της αλκαλικής φωσφατάσης υπήρχε στη βουτυρόκρεμα του γάλακτος και κατά την ανάδευση της κρέμας με σκοπό την παραγωγή γάλακτος, διαπερνούσε στο γάλα η μισή ποσότητα από αυτή που πριν είχε παρατηρηθεί στην κρέμα γάλακτος (Kay & Graham, 1933). Κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας του γάλακτος, η δραστηριότητα της ALP έδειξε πτωτική τάση στο αίγιο και το πρόβριο γάλα, σε αντίθεση με το αγελαδινό, στο οποίο παρατηρήθηκε βραδεία απενεργοποίηση της ALP. (Vamvakaki et al., 2006). Η μείωση της δραστηριότητας της ALP, που μελετήθηκε από τους Vamvakaki et al. (2006), βασίστηκε στη χρήση θερμικής επεξεργασίας και συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα των 5 ml και από τα 3 είδη γάλακτος, τα οποία θερμάνθηκαν στους 59 ° C για χρονικό διάστημα 5- 80 λεπτά.

Οι Wilińska et al, το 2007, απέδειξαν επίσης, πως η σταθερότητα της ALP σε αγελαδινό γάλα ήταν πολύ υψηλότερη συγκριτικά με αυτή που υπήρχε στο αιγοπρόβριο γάλα. Το θερμοκρασιακό εύρος που χρησιμοποίησαν για τη θερμική επεξεργασία των δειγμάτων ήταν μεγαλύτερο και κυμαινόταν από 54- 69 ° C για 1- 180 λεπτά. Και σε αυτή τη μελέτη τα ποσοστά ALP στο αγελαδινό παστεριωμένο γάλα ήταν υψηλότερα από αυτά στο αιγοπρόβριο. (Wilińska et al, 2007, EFSA,2021).

Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν και οι Dumitrașcu et al, το 2014, που χρησιμοποίησαν μια φθοριομετρική μέθοδο, σε πλήρες και αποβουτυρωμένο γάλα. Στο πλήρες γάλα, σε χαμηλή θερμοκρασία η υπολειμματικότητα της alp, ήταν υψηλότερη στο γίδινο γάλα, λόγω περισσότερων λιπαρών. Όσο η θερμοκρασία αυξανόταν, μειωνόταν η υπολειμματικότητα στο γίδινο, ενώ στο αγελαδινό διαπιστώθηκε σταθερότητα. Σχετικά με το αποβουτυρωμένο γάλα, το γίδινο παρουσίασε τη μικρότερη δραστηριότητα σε alp, ακολουθούμενο από το πρόβριο και τέλος το αγελαδινό, στο οποίο, διαπιστώθηκε σχεδόν η υπερδιπλάσιο ποσότητα σε σχέση με τα άλλα δύο είδη. Οπότε το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν, είναι πως η alp στο αγελαδινό γάλα παρουσιάζει μεγαλύτερη ανεκτικότητα στην αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα. (Dumitrașcu et al, 2014,EFSA,2021).

Αντίθετα, βέβαια με τις παραπάνω έρευνες είναι όσα μελέτησαν ο Klotz και οι συνεργάτες του, που επιχείρησαν να αξιολογήσουν τη μέθοδο Fluorophos και τη χρωματομετρική ανάλυση MFO-3, για την ανίχνευση της ALP σε νωπό και παστεριωμένο δείγμα. Τα αποτελέσματα της έρευνάς τους έδειξαν πως και στα τρία είδη γάλακτος η μείωση του ενζύμου κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα. (Klotz et al., 2008).

Σύμφωνα με τα παραπάνω λοιπόν , διαπιστώνεται πως υπάρχει βραδύτερη μείωση της δραστηριότητας ALP στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με εκείνη στο αίγαιο και το πρόβειο γάλα, ενώ το τελευταίο είχε την ταχύτερη μείωση της δραστηριότητας ALP. Αναφέρθηκε, επίσης, μια γραμμική σχέση μεταξύ των υπόλοιπων δραστηριοτήτων ALP που αποκτήθηκαν και με τις δύο μεθόδους χρονικά κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας στους 59 °C. Ωστόσο, οι ευαισθησίες των δύο μεθόδων για την ανίχνευση της δραστηριότητας ALP δεν προσδιορίστηκαν. Σε ορισμένες μελέτες, το επίπεδο ALP στο γάλα ποικίλλει ευρέως ανάλογα με την εποχή, τη φυλή της αγελάδας και το στάδιο της γαλουχίας. Το αίγαιο και το πρόβειο γάλα περιέχει φυσικά ALP περίπου στο 10 και 500%, αντίστοιχα, του επιπέδου στο αγελαδινό γάλα. Προς το παρόν, το καναδικό ανώτατο επίπεδο υπολειμματικού ALP στο παστεριωμένο αιγοπρόβειο γάλα είναι το ίδιο με αυτό του αγελαδινού γάλακτος. Λόγω των διακυμάνσεων στα αρχικά επίπεδα ALP, έχει προταθεί να οριστούν διαφορετικά νομικά όρια για το γάλα από διαφορετικά είδη για να επαληθευτεί η επάρκεια της παστερίωσης (Klotz et al.,2008).

Επιπροσθέτως , κάποιες χρωματομετρικές μέθοδοι έχουν ουσιαστικά λιγότερη ευαισθησία και έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικό ποσοστό αποτυχίας, ακόμη και 0,8% παραπάνω από τα επίπεδα του νωπού γάλακτος. Με σκοπό να αυξήσουν την ευαισθησία των χρωματομετρικών αναλύσεων για μη-αγελαδινό γάλα, οι Williams & Nottingham, τροποποίησαν τη διαδικασία ανάλυσης Aschaffenburg και Mullen αυξάνοντας τον όγκο του δείγματος. Η εφαρμογή στο αίγαιο γάλα αποδείχθηκε ικανοποιητική. Ακόμη, οι τιμές της ALP στο αίγαιο γάλα έχουν αναφερθεί ότι ποικίλλουν αρκετά, με μικρή ή καθόλου συσχέτιση με την περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος και με τα στερεά συστατικά του γάλακτος (Williams & Nottingham,1990).

Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι σε περιπτώσεις μαστίτιδας, στο γάλα εντοπίζεται μεγαλύτερη δραστηριότητα της ALP (Anifantakis & Rosakis, 1983).

Η Barbosa θεώρησε πως οι διαφορές στην περιεκτικότητα σε λιπαρά τόσο του αίγιου όσο και του πρόβειου γάλακτος που χρησιμοποιούνται για την άμεση ανθρώπινη κατανάλωση ή την παραγωγή τυριών έχουν επίδραση στην απόδοση των διαθέσιμων δοκιμών ALP. (Barbosa, 2005).

Επίσης ,από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από το IZSLT (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana), διαπιστώθηκε η μεταβλητότητα των ορίων για τη σωστή παστερίωση του κάθε είδους και πως θα πρέπει να προσαρμοστούν αναλόγως. Έτσι, με βάση τα δεδομένα που είχαν στη διάθεσή τους συμπεράναν πως για να είναι επαρκώς παστεριωμένο το γίδινο γάλα, τα επίπεδα της ALP πρέπει να βρίσκονται κάτω από το όριο των 330 mU /L, ενώ για το πρόβειο, κάτω από 530 mU /L. (EFSA,2021).

### *Γάλα καμήλας*

Περιορισμένες είναι οι μελέτες που αναφέρονται στην αξιολόγηση της δραστηριότητας ALP στο γάλα καμήλας, τόσο στο νωπό , όσο και στο παστεριωμένο. Μια από αυτές τις έρευνες πραγματοποιήθηκε από τους Lorenzen et al., το 2011. Οι προαναφερθέντες παρατήρησαν πως οι τιμές της alp στο παστεριωμένο γάλα, δεν παρουσίαζαν μεγάλη απόκλιση από εκείνες που ανευρέθηκαν στο νωπό γάλα. Αξιοσημείωτο να αναφερθεί πως οι τιμές μετρήθηκαν και με φθοριομετρική μέθοδο αλλά και με χρωματογραφική.



Το συμπέρασμα, στο οποίο οδηγήθηκαν λοιπόν ήταν πως η αλκαλική φωσφατάση δεν είναι το κατάλληλο ένζυμο για την επαλήθευση της σωστής παστερίωσης του γάλακτος καμήλας, λόγω αυξημένης εναπομένουσας δραστηριότητας. (Lorenzen et al., 2011, EFSA, 2021).

Στο ίδιο ακριβώς συμπέρασμα κατέληξε και η επιστημονική ομάδα του Wernery, οι οποίοι χρησιμοποίησαν συνολικά τέσσερις μεθόδους για την εξακρίβωση της επαρκούς παστερίωσης, μια φθοριομετρική, μια φωτομετρική και δύο χρωματογραφικές. Παρατήρησαν πως το ποσοστό μείωσης έπειτα από αρκετή ώρα που είχε υποβληθεί το γάλα σε θερμική επεξεργασία, ήταν ελάχιστο και πως το ένζυμο δεν είχε απενεργοποιηθεί, σχεδόν καθόλου, έπειτα από θέρμανση στους 72 °C, η οποία είναι και η αποδεκτή θερμοκρασία παστερίωσης HTST, για τα υπόλοιπα είδη. (Wernery et al., 2006, EFSA, 2021).

### *Βουβαλίσιο γάλα*

Ακόμη μικρότερος είναι ο όγκος των ερευνών που αφορούν στο βουβαλίσιο γάλα. Μια από αυτές, παρουσίασε ότι η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης του βουβαλίσιου γάλακτος δε σχετίζεται ιδιαίτερα με τη δραστηριότητα του αντίστοιχου ενζύμου στο αγελαδινό γάλα. Παρ' όλα αυτά όμως, ο βαθμός επανενεργοποίησης στις δύο ALP είναι παραπλήσιος. Το 2000, από την ομάδα του Lombardi, διαπιστώθηκε ότι η δραστηριότητα και ο ρυθμός απενεργοποίησης της αλκαλικής φωσφατάσης σε νωπό βουβαλίσιο γάλα περατώνονται με μέγιστη ευαισθησία στους 60 °C, ενώ στους 70 °C το ένζυμο είναι πλήρως απενεργοποιημένο. Επιπλέον, η δραστηριότητα του ενζύμου δε φάνηκε να διαφέρει ιδιαίτερα μεταξύ βουβαλίσιου και αγελαδινού γάλακτος, ενώ συγκεντρώνεται και στις δύο περιπτώσεις στην κρεμώδη φάση. Η δραστηριότητα παραμένει σταθερά υψηλότερη από αυτή του αίγιου γάλακτος. Τέλος, στη θερμική επεξεργασία και των τεσσάρων ειδών γάλακτος (αίγιο, πρόβιο, αγελαδινό και βουβαλίσιο) με σκοπό την αδρανοποίηση της ALP, το πρωτόκολλο που ακολουθείται, δε διαφέρει (Lombardi et al., 2000).

Σε μελέτη που διεξήχθη από τη Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων και τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας μιας μεθόδου χημειοφωταύγειας για ALP στα 50, 100, 350 και 500 mU/mL σε ολόκληρο το γάλα πολλαπλών ειδών, τέθηκαν νέοι κανονισμοί στις ΗΠΑ, ενώ προτάθηκαν κάποιοι στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή. Δεκαπέντε εργαστήρια από 8 χώρες αξιολόγησαν γάλα αγελάδων, αιγών, προβάτων και βουβάλων, αποβουτυρωμένο γάλα αγελάδας, κρέμα 20% σε λιπαρά και σοκολάτα γάλακτος 2% λιπαρών. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αποκάλυψαν ότι η συγκεκριμένη μέθοδος ήταν συγκρίσιμη με τις φθορισμομετρικές αναλύσεις και υπέδειξαν ότι η μέθοδος χημειοφωταύγειας είναι κατάλληλη για τη μέτρηση της ALP στο γάλα πολλαπλών ειδών και σε υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα σε ΗΠΑ και ΕΕ, σε επίπεδα χαμηλότερα των 350 mU/mL (Salter & Fitchen, 2006).



## *Ονόγαλα*

Σε έρευνα του 2009, από τους Marchand et al. (Marchand et al., 2009), εξετάστηκε η αλκαλική φωσφατάση που περιέχεται στο γάλα υποειδών, το οποίο εμφανίζει και σημαντική ομοιότητα με το ονόγαλα. Στόχος της έρευνας αυτής ήταν η απόδειξη της ικανότητας της ίππειας ALP να φανεί χρήσιμη ή όχι σαν ενζυμικός δείκτης του γάλακτος. Αν και, από κινητική άποψη, το ένζυμο εμφανίζει δυναμική ως δείκτης για τη σωστή παστερίωση του γάλακτος, εντούτοις δεν μπορεί να αξιοποιηθεί λόγω του χαμηλού ενδογενούς επιπέδου ενζύμου που υπάρχει στο γάλα υποειδών, και συνεπώς και στο ονόγαλα, και της έλλειψης ευαισθησίας της μεθόδου της φθορισμομετρίας (Marchand et al., 2009).

Συγκεκριμένα, για την εκτίμηση της ALP στο νωπό γάλα των υποειδών πραγματοποιήθηκε κλασματοποίηση με φυγοκέντρηση, τόσο σε γάλα με λιπαρά, όσο και σε αποβουτυρωμένο γάλα. Τα αποτελέσματα από το γάλα υποειδών, και άρα και από το ονόγαλα, και συγκριτικά με το αγελαδινό γάλα, έδειξαν ότι η δραστηριότητα της ALP ήταν πολύ χαμηλότερη, καθώς επίσης και η κατανομή των ενζύμων στο γάλα ήταν τελείως διαφορετική. (Marchand et al., 2009). Αυτό είναι πολύ πιθανό να οφείλεται και στο μικρότερο ποσοστό λίπους που ανευρίσκεται στο συγκεκριμένο είδος γάλακτος.

### *2.4.11 Ζητήματα – περιορισμοί που προκύπτουν από τις δοκιμές ALP στο γάλα*

Στον κώδικα Codex διατυπώνονται κάποιοι προβληματισμοί για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Αυτοί αφορούν κυρίως την επανενεργοποίηση της ALP αλλά και κάποιους μικροοργανισμούς, οι οποίοι ευθύνονται για την παραγωγή της μικροβιακής αλκαλικής φωσφατάσης και άλλων ουσιών, που έχουν ως αποτέλεσμα της υπολειμματικότητας της ALP στο παστεριωμένο γάλα. (EFSA, 2021).

Σχετικά με τους κινδύνους που αναφέρθηκαν στην ενότητα 2.2 και οφείλονται στους μικροβιακούς παράγοντες, που μπορούν να αυξήσουν την alp, ελαττώνονται σε μεγάλο βαθμό με την παστερίωση. Υπάρχει ωστόσο μεγάλη πιθανότητα να προκύψουν αστοχίες κατά τη διάρκεια της παστερίωσης. Οι αστοχίες αυτές μπορεί να οφείλονται είτε σε αποτυχία επίτευξης του κατάλληλου θερμοκρασιακού εύρους για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα, είτε σε διασταυρούμενη μόλυνση του παστεριωμένου γάλακτος με νωπό. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο και σημαντικό να πραγματοποιούνται ταχείες δοκιμές μετά την παστερίωση, για την επιβεβαίωση ότι έχει επιτευχθεί σωστή και αποτελεσματική επεξεργασία και δεν υπάρχει κίνδυνος για την υγεία του καταναλωτή.

Βέβαια, υπάρχουν και μικροοργανισμοί οι οποίοι αποτελούν εξαίρεση και μπορούν επιβιώνουν και μετά από την παστερίωση. Πρόκειται για κάποια βακτήρια που είναι πολύ ανθεκτικά στη θερμότητα, για βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια, τα οποία επιβιώνουν σε συνθήκες παστερίωσης και για κάποια ψυχρόφιλα βακτήρια, που αναπτύσσονται στις χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης, μετά την παστερίωση και έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση του προϊόντος. (Martin et al., 2018).

Σχετικά με το ποσοστό του ενζύμου που συναντάται στο κάθε είδος γάλακτος διαφέρει μεταξύ ειδών αλλά και φυλών. Συνεπώς η υπολειμματικότητα της ALP στο κάθε είδος,

ναι μεν θα είναι μειωμένη συγκριτικά με αυτή που βρίσκεται στο νωπό γάλα, αλλά θα διαφέρει μετά την παστερίωση μεταξύ των ειδών. Επομένως, είναι διαφορετική και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ανάλογα με το είδος γάλακτος, το είδος παστερίωσης που υπέστη το δείγμα αλλά και τη μέθοδο δοκιμής alp, η οποία μπορεί να αποδειχθεί πως τελικά δεν είναι η κατάλληλη. (EFSA,2021).

Εξίσου σημαντικό ρόλο έχει η σύνθεση του γάλακτος και ειδικότερα η περιεκτικότητά του σε λιπαρά του δείγματος, διότι η ALP απορροφάται εύκολα στο γάλα με πολλά λιπαρά, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, από μελέτες που πραγματοποίησαν οι Painter και Bradley, το 1997. Συγκεκριμένα παρατήρησαν πως στο γάλα που περιείχε τα λιγότερα λιπαρά, η ποσότητα της ALP ήταν 50% λιγότερη από το πλήρες σε λιπαρά γάλα, κατά τη διαδικασία της ταχείας παστερίωσης HTST. (Painter & Bradley, 1997).

Επιπροσθέτως, τον προσδιορισμό του συγκεκριμένου ενζύμου μπορούν να τον επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τα πρόσθετα, όπως οι χρωστικές και οι αρωματικές ουσίες, (Murthy et al.,1992) ή ακόμα και τα αντιβιοτικά, όπως η πενικιλίνη και η οξυτετρακυκλίνη ( Manolkidis et al., 1971) και να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, κυρίως όταν χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές τεχνικές. (Rankin et al., 2010).

Συνεπώς, όταν επιχειρείται η μέτρηση και ο προσδιορισμός της ALP, είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπ' όψη οι παραπάνω περιορισμοί και να πραγματοποιούνται οι κατάλληλοι χειρισμοί και επαναλήψεις, ώστε να μην δημιουργηθεί λανθασμένο συμπέρασμα.

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Συλλογή Δειγμάτων
- Επεξεργασία Δειγμάτων (ταχεία και βραδεία παστερίωση)
- Μικροβιολογικός Έλεγχος Δειγμάτων
- Προσδιορισμός δραστηριότητας αλκαλικής φωσφατάσης με ποιοτικές και ποσοτικές δοκιμές
- Συγκριτική Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Αναλυτικά:

#### 3.1 Δειγματοληψία

Συνολικά συλλέχτηκαν 12 δείγματα νωπού γάλακτος 500ml σε αποστειρωμένους περιέκτες, από φάρμες προβάτων, αιγών, βουβάλων και αγελάδων στην Ελλάδα και φάρμες όνων και καμηλών στην Κύπρο. Τα δείγματα επιμερίστηκαν σε αναλυτικά δείγματα των 50 ml και συντηρήθηκαν υπό κατάψυξη (-18 °C) μέχρι και την ανάλυση

τους. Μετά την ελεγχόμενη ψύξη απόψυξη, ελέγχθηκε το pH τους για να διαπιστωθεί η καταλληλότητά τους για περαιτέρω ανάλυση εις διπλούν.

### 3.2 Επεξεργασία Δειγμάτων (ταχεία και βραδεία παστερίωση)

Όλα τα νωπά δείγματα (12) υποβλήθηκαν σε ταχεία (72°C, 15sec) και βραδεία (63°C, 30min) παστερίωση

#### 3.2.1 Υλικά-Μέθοδοι

Στον Πίνακα IV παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την θερμική επεξεργασία των δειγμάτων

***Πίνακας IV: Υλικά και Σκεύη για τη συλλογή των δειγμάτων και την παστερίωσή τους.***

Ταχεία Παστερίωση	Βραδεία Παστερίωση
Κωνικές φιάλες 250 ml	Μεταλλικός περιέκτης
Υδατόλουτρο	Θερμαντική πλάκα
Θερμόμετρο	Θερμόμετρο
Φιαλίδια τύπου Falcon	Φιαλίδια τύπου Falcon
Χρονόμετρο	Χρονόμετρο

Αναφορικά με τις μεθόδους θερμικής επεξεργασίας που εφαρμόστηκαν, τα βήματα που ακολουθήθηκαν αφορούν τα εξής:

Κατά την παστερίωση των δειγμάτων με την μέθοδο HTST, πραγματοποιήθηκε λήψη γάλακτος όγκου 200 ml, σε κωνικές φιάλες. Η θέρμανση έλαβε χώρα σε υδατόλουτρο, ενώ με θερμόμετρο, ελεγχόταν συνεχώς η θερμοκρασία. Μόλις έφτασε στους 72 °C, περιμέναμε για 15 δευτερόλεπτα (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9.** Διαδικασία ταχείας παστερίωσης στο υδατόλουτρο. Η θερμοκρασία παρακολουθείται με ψηφιακό και αναλογικό θερμόμετρο.

Για την παστερίωση LTLT τα 200 ml κάθε δείγματος νωπού γάλακτος τοποθετήθηκαν σε μεταλλικούς περιέκτες και εν συνεχεία σε θερμαντικές πλάκες, στις οποίες παρέμειναν για 30 λεπτά στους 63°C.

Τα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα (24) συντηρήθηκαν υπό ψύξη ή κατάψυξη για το μικροβιολογικό και χημικό τους περαιτέρω έλεγχο αντίστοιχα.

### 3.3 Μικροβιολογικός Έλεγχος Δειγμάτων

Για το μικροβιολογικό έλεγχο των 72 δειγμάτων (νωπών και θερμικά επεξεργασμένων) προσδιορίστηκαν η OMX και τα εντεροβακτηριοειδή.

#### 3.3.1. Προσδιορισμός OMX

##### 3.3.1.1 Υλικά-Μέθοδοι

Στον Πίνακα V παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της OMX στα δείγματα γάλακτος

**Πίνακας V:** Υλικά για τον προσδιορισμό OMX

Σκεύη	Αντιδραστήρια
Φιαλίδια τύπου Falcon (15 και 50 ml)	Buffered Peptone Water (BPW)
Τρυβλίο Petri	Θερμοστατημένο θρεπτικό υλικό Plate Count Agar (PCA)
Πιπέτα ακριβείας	
Κλίβανοι επώασης (37 °C και 30 °C)	

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό της OMX αφορούσαν τα εξής:

-Δεκαδικές αραιώσεις: Για την αραιώση, τοποθετήθηκαν 9 ml διαλύματος μέγιστης ανάκτησης σε περιέκτες των 15 ml, και στα νωπά δείγματα, αλλά και στα δείγματα που παστεριώθηκαν, τόσο με την ταχεία όσο και με την βραδεία μέθοδο. Η αραιώση πραγματοποιήθηκε με αναλογία 1:10, με αραιωτικό διάλυμα BPW, λαμβάνοντας κάθε φορά 1 ml δείγματος, από κάθε είδος γάλακτος, και συμπληρώνοντας 9 ml BPW.

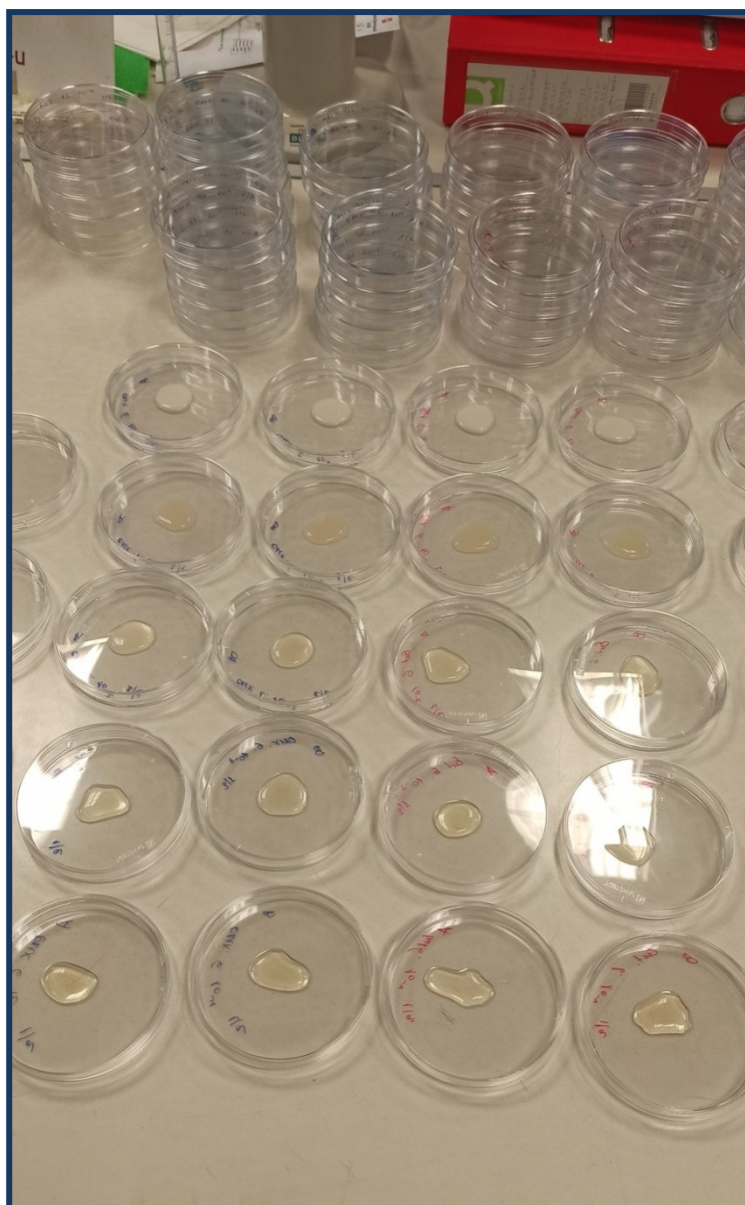
- Ενοφθαλμισμός υποστρώματος: Το αραιωμένο διάλυμα ανακινήθηκε, ώστε να αναμιχθεί σωστά, και τοποθετήθηκε 1 ml του στο τρυβλίο Petri με θερμοστατημένο θρεπτικό υλικό PCA agar, σε ποσότητα 15-20 ml.

-Επώαση: Τα δείγματα επώαστηκαν στους 30 °C, για 72 ώρες.

- Καταμέτρηση αποικιών

-Υπολογισμός OMX ανά δείγμα

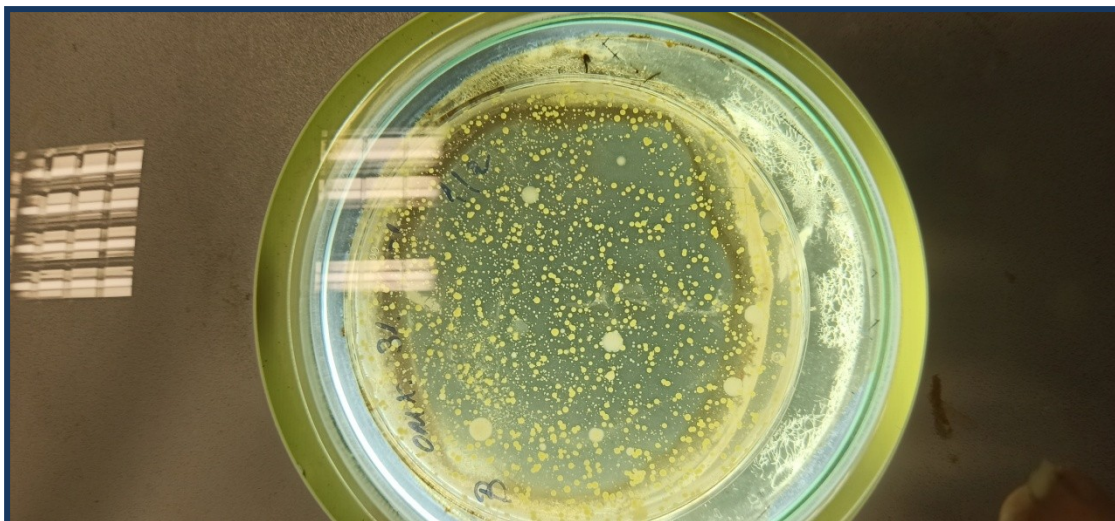
Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν (σύνολο 72 δείγματα)



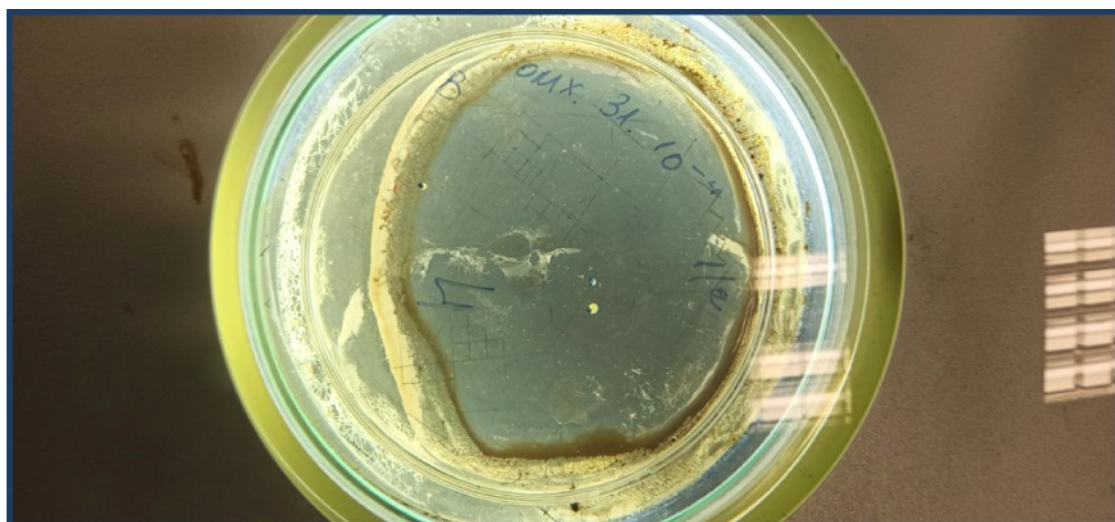
**Εικόνα 10.** Ενοφθαλμισμός του νωπού δείγματος και των περαιτέρω αραιώσεων, στα τρυβλία Petri. Διακρίνονται και τα στοιχεία της κάθε καλλιέργειας, που έχουν καταγραφεί στο εκάστοτε τρυβλίο. Αποτελούν την ταυτότητα των τρυβλίων.

Στις εικόνες που ακολουθούν (11-12), παρατηρούμε τα αποτελέσματα της OMX από τις αραιώσεις του δείγματος 31, που αντιστοιχεί σε νωπό γάλα καμήλας, στο μικροσκόπιο.





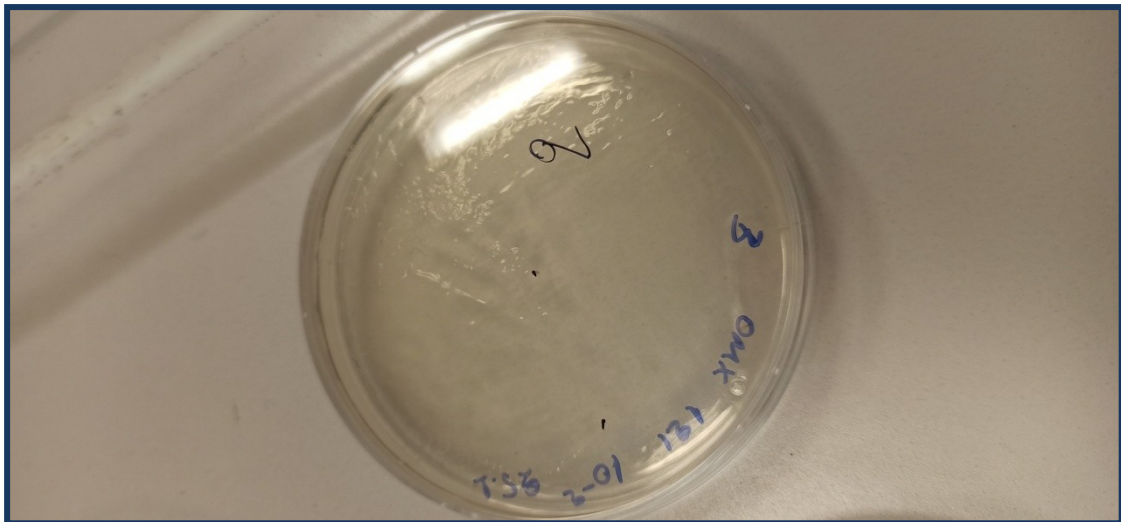
**Εικόνα 11.** Δείγμα 31, με μια αραιώση.



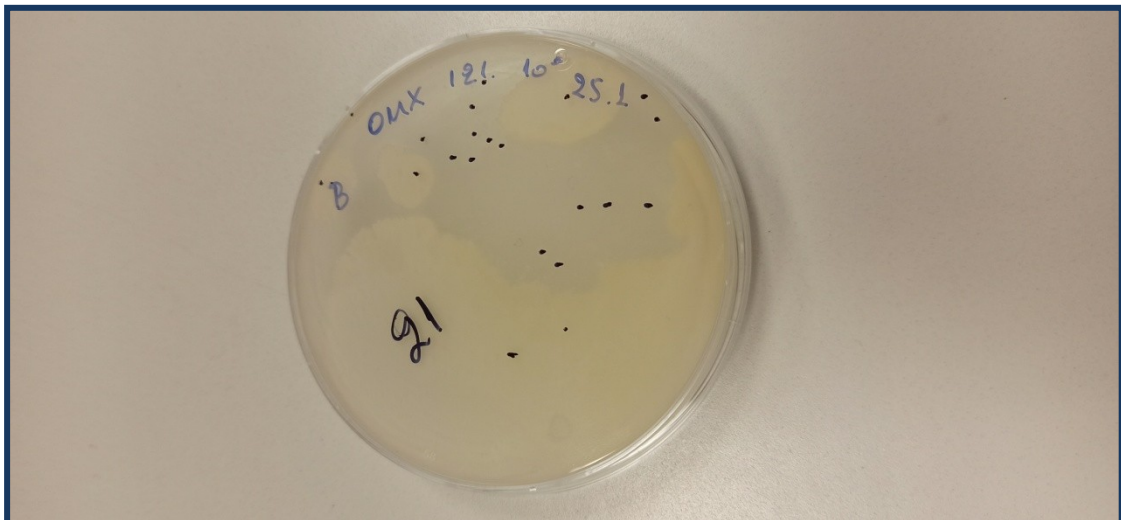
**Εικόνα 12.** Δείγμα 31, με τέσσερις αραιώσεις.

Ομοίως, στις παρακάτω φωτογραφίες (13-14) παρατηρούμε τα τρυβλία διαφόρων δειγμάτων, με τα αποτελέσματα της OMX, με γυμνό μάτι.





**Εικόνα 13.** Τρυβλίο Petri, με 2 αποικίες OMX. Πάνω του διακρίνονται και τα στοιχεία της καλλιέργειας.



**Εικόνα 14.** Τρυβλίο Petri, με 21 αποικίες OMX. Πάνω του διακρίνονται και τα στοιχεία της καλλιέργειας.

### **3.3.2. Προσδιορισμός Εντεροβακτηριοειδών**

#### **3.3.2.1 Υλικά-Μέθοδοι**

Στον Πίνακα VI Παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό εντεροβακτηριοειδών στα δείγματα γάλακτος.

**Πίνακας VI: Υλικά , Σκεύη και Αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό Εντεροβακτηριοειδών**

Σκεύη	Αντιδραστήρια
Φιαλίδια τύπου Falcon (15 και 50 ml)	Buffered Peptone Water (BPW)
Τρυβλίο Petri	Θερμοστατημένο θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)
Πιπέτα ακριβείας	Φορμικό οξύ
Οδοντογλυφίδα	Matrix
Κλίβανοι επώασης (37 °C και 30 °C)	Maldi-Tof
Μεταλλική πλακέτα	

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό των Εντεροβακτηριοειδών αφορούσαν τα εξής:

-Δεκαδικές αραιώσεις: Για την αραιώση, τοποθετήθηκαν 9 ml διαλύματος μέγιστης ανάκτησης σε περιέκτες των 15 ml, και στα νωπά δείγματα, αλλά και στα δείγματα που παστεριώθηκαν, τόσο με την ταχεία όσο και με την βραδεία μέθοδο. Η αραιώση πραγματοποιήθηκε με αναλογία 1:10, με αραιωτικό διάλυμα BPW, λαμβάνοντας κάθε φορά 1 ml δείγματος, από κάθε είδος γάλακτος, και συμπληρώνοντας 9 ml BPW.

- Ενοφθαλμισμός υποστρώματος: Το αραιωμένο διάλυμα ανακινήθηκε, ώστε να αναμιχθεί σωστά, και τοποθετήθηκε 1 ml του στο τρυβλίο Petri με θερμοστατημένο θρεπτικό υλικό VRBG agar, σε ποσότητα 15 ml. Μόλις αυτό στερεοποιήθηκε, ακολούθησε επιστιβάδευση ποσότητας 15 ml.

-Επώαση: Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C, για 21-24 ώρες.

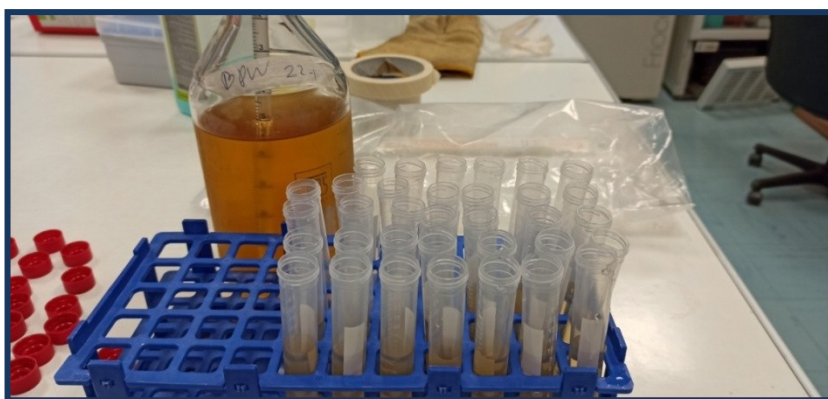
- Καταμέτρηση αποικιών

-Υπολογισμός Enterobacteriaceae ανά δείγμα

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν εις διπλούν.

Στις εικόνες 15 και 16 που ακολουθούν , φαίνονται σχηματισμένες αποικίες Enterobacteriaceae.

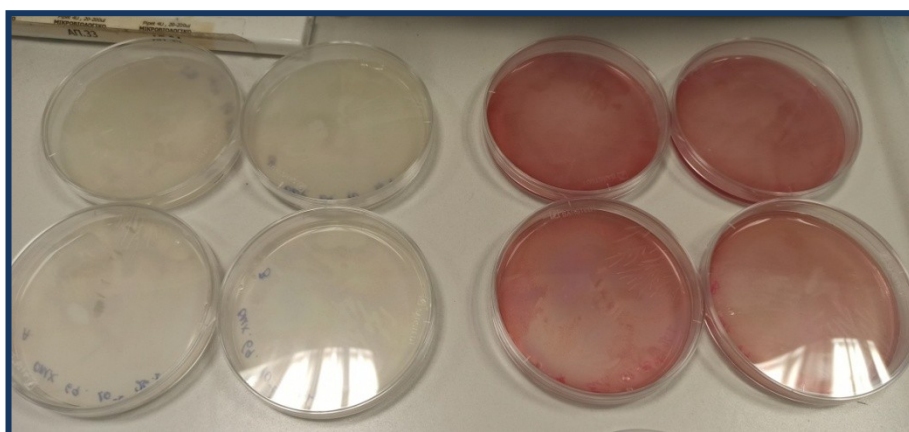




**Εικόνα 17.** Προετοιμασία των αραιώσεων. Στον πάγκο εργασίας διακρίνονται το στατώ, οι περιέκτες Falcon (15 ml) και το αραιωτικό διάλυμα BPW.



**Εικόνα 18.** Θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA και PCA, αντίστοιχα



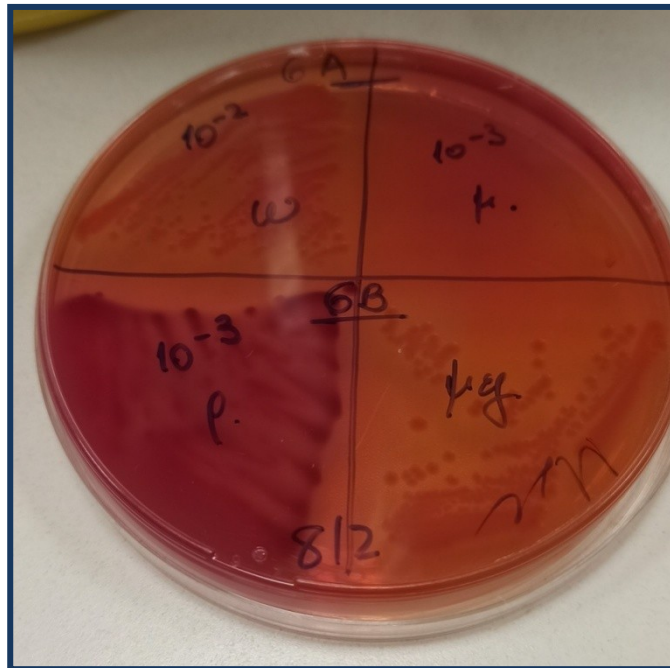
**Εικόνα 19.** Τρυβλία Petri, μετά την επώασή τους. Στα αριστερά πρόκειται για αποικίες OMX, ενώ στα δεξιά για αποικίες *enterobacteriaceae*.



Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που αφορούσαν τα εντεροβακτηριοειδή , χρησιμοποιήθηκε Maldi-Tof και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Προσθήκη δείγματος στην πλακέτα: Δείγμα από κάθε αποικία της ανακαλλιέργειας απλώθηκε στη ειδική μεταλλική πλακέτα με μια οδοντογλυφίδα
- Προσθήκη αντιδραστηρίων: Μόλις απομακρύνθηκε η περιττή υγρασία, προστέθηκε 1 μl φορμικό οξύ 70% και αφού στέγνωσε και αυτό, προστέθηκε και 1 μl matrix.
- Τοποθέτηση πλακέτας στο Maldi-tof
- Ταυτοποίηση και καταγραφή μικροβίων

Στις εικόνες που ακολουθούν, φαίνονται κάποιοι τύποι ανακαλλιεργειών (Εικόνα 20), η πλακέτα ταυτοποίησης (Εικόνα 21), και το φύλλο εργασίας με την απαραίτητη κωδικοποίηση (Εικόνα 22).



**Εικόνα 20.** Τρυβλίο Petri με ανακαλλιέργειες.



**Εικόνα 21.** Η μεταλλική πλακέτα για την ταυτοποίηση των μικροβίων με MALDI-TOF MS.

ID: 101.1002#33.

**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΜΕ MALDI-TOF MS**

Ημερομηνία δοκιμής:  
Project name:

Ημερομηνία παρασκευής matrix:

A1		A2		A3		A4		A5		A6		A7		A8		A9		A10		A11		A12	
1B	10 <sup>-2</sup>	1B	10 <sup>-2</sup>	1B	10 <sup>-3</sup>	6A	10 <sup>-2</sup>	6A	10 <sup>-3</sup>	6B	10 <sup>-3</sup>	6B	10 <sup>-3</sup>	6B	10 <sup>-4</sup>	11A	10 <sup>-2</sup>	11A	10 <sup>-2</sup>	11A	10 <sup>-2</sup>	11A	10 <sup>-2</sup>
Ρ.	ω.	ω.	ω.	στρ.μικρ.	ω.	ω.	κ.	κ.	κ.	κ.	κ.	κ.	κ.	κ.	μ.α.	μ.α.	μ.α.	μ.α.	μ.α.	μ.α.	μ.α.	μ.α.	
11B	10 <sup>-2</sup>	11B	10 <sup>-2</sup>	11B	10 <sup>-2</sup>	16A	10 <sup>-2</sup>	16A	10 <sup>-2</sup>	16A	10 <sup>-3</sup>	16A	10 <sup>-3</sup>	16B	10 <sup>-2</sup>	16B	10 <sup>-2</sup>	16B	10 <sup>-2</sup>	16B	10 <sup>-2</sup>	16B	10 <sup>-4</sup>
Ρ.	μ.α.	μ.α.	μ.α.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	ω.	
21A	10 <sup>-2</sup>	21A	10 <sup>-1</sup>	21B	10 <sup>-1</sup>	21B	10 <sup>-1</sup>	21B	10 <sup>-1</sup>	26A	10 <sup>-1</sup>	26A	10 <sup>-1</sup>	26A	10 <sup>-1</sup>	26B	10 <sup>-1</sup>	26B	10 <sup>-1</sup>	26B	10 <sup>-1</sup>	26B	10 <sup>-1</sup>
ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	ω.ρ.	
41A	10 <sup>-1</sup>	41A	10 <sup>-1</sup>	41A	10 <sup>-1</sup>	41A	10 <sup>-1</sup>	41A	10 <sup>-1</sup>	46A	10 <sup>-1</sup>	46A	10 <sup>-1</sup>	46B	10 <sup>-1</sup>	46B	10 <sup>-1</sup>	46B	10 <sup>-1</sup>	46B	10 <sup>-1</sup>	46B	10 <sup>-1</sup>
μ.α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	α.	
56A	10 <sup>-1</sup>																						
ρ.ψ.α.																							

Πρόγραμμα:  
Βιβλιοθήκη:

ΑΝΑΛΥΤΕΣ	
Κυρίτση Μαρία	
Κολοκυθοπούλου Φωτεινή	
Δασκαλάκη Αγγελική	

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	
Κυρίτση Μαρία	
Ημερομηνία:	Κολοκυθοπούλου Φωτεινή
Ημερομηνία:	

**Εικόνα 22.** Το φύλλο εργασίας για την ταυτοποίηση των μικροβίων με MALDI-TOF MS. Ο αριθμός συμβολίζει και τον αριθμό του δείγματος, το κεφαλαίο γράμμα τη σειρά των τρυβλίων (A για την πρώτη και B για τη δεύτερη), το εκθετικό την αραιώση που έχει υποστεί το δείγμα, ενώ στην τρίτη σειρά του κελιού καταγράφεται το είδος της αποικίας (πχ: Ρ: ραβδοειδής, Στρ. μικρ: στρόγγυλη μικρή και μ. α: με άλω)

### 3.4 Προσδιορισμός δραστηριότητας αλκαλικής φωσφατάσης με ποιοτικές δοκιμές

Από τα εμπορικά διαθέσιμα ποιοτικά τεστ για τον ποιοτικό προσδιορισμό της αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα, τυχαία επιλέχθηκαν 3:

- Lactognost (HEYL)
- Phosphatesmo
- Kairosafe (Lactopast)

#### 3.4.1 Υλικά-Μέθοδοι

Η 1<sup>η</sup> μέθοδος που εφαρμόστηκε από τα ποιοτικά τεστ ήταν η δοκιμή ALP με LACTOGNOST.

Η δοκιμή Lactognost (Εικόνα 23) απαρτίζεται από τρία (3) αντιδραστήρια: τα Lactognost I, II και III. Το Lactognost I, αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα, για τη ρύθμιση του υπό εξέταση δείγματος γάλακτος, το Lactognost II είναι φαινυλοφωσφορικό δινάτριο, και το Lactognost III χλωροϊμινοδιβρωμοκινίνη. Πρόκειται για έναν ποιοτικό προσδιορισμό της δραστηριότητας της Αλκαλικής Φωσφατάσης στο γάλα, την γαλακτική πρωτεΐνη, την κρέμα και το βούτυρο. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης προκύπτει αρκετά σύντομα, σε λίγο περισσότερο από μια ώρα, αφού απαιτείται επώαση των δειγμάτων στους 37 °C για μία ώρα. Ωστόσο, είναι από τις πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές, τόσο σε εργαστηριακό, όσο και σε ακαδημαϊκό επίπεδο.



**Εικόνα 23.** Ταμπλέτες lactognost I, lactognost II και σκόνη lactognost III. Στο κουτί περιγράφονται οι πιθανές χρώσεις των δειγμάτων γάλακτος, ανάλογα με το βαθμό παστερίωσής τους.



Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή Lactognost παρουσιάζονται στο πίνακα VII

**Πίνακας VII: Υλικά και Αντιδραστήρια για τη ποιοτική δοκιμή ALP - Lactognost.**

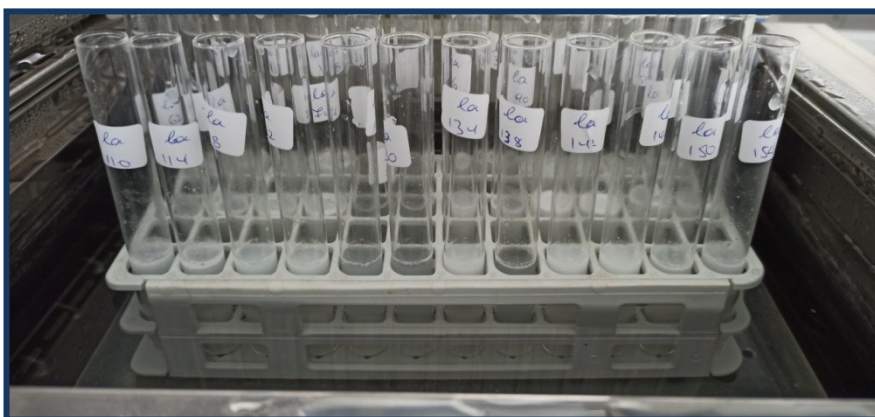
Σκεύη	Αντιδραστήρια
(72) Δοκιμαστικοί σωλήνες 10 ml	lactognost I (ταμπλέτα)
Πιπέτα ογκομέτρησης 1 ml	lactognost II (ταμπλέτα)
Μικρός Κλίβανος επώασης (37 °C)	lactognost III (σκόνη)
Γυάλινη Ράβδος	
Στατό	

Αρχικά, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα διαλύθηκε μια ταμπλέτα lactognost I (Εικόνα 24) και στη συνέχεια μια ταμπλέτα lactognost II, σε όγκο νερού ίσου με 10 ml (Εικόνα 25). Για την πλήρη αποσύνθεση των ταμπλετών, ανακινήθηκαν καλά οι δοκιμαστικοί σωλήνες, ενώ γίνεται χρήση της γυάλινης ράβδου, όπου ήταν χρήσιμο. Στη συνέχεια, 1 ml γάλακτος, παστεριωμένου (ταχέως και βραδέως) και νωπού, τοποθετήθηκε στους σωλήνες, οι οποίοι με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν προς επώαση στους 37 °C για μία (1) ώρα (Εικόνα 26). Μόλις αφαιρέθηκαν από τον κλίβανο, σε κάθε δείγμα προστέθηκε μία (1) κουταλιά αντιδραστηρίου lactognost III. Εντός δέκα (10) λεπτών, το περιεχόμενο των σωλήνων χρωματίστηκε (Εικόνα 27). Ανάλογα με το επικρατούν χρώμα, ήμασταν σε θέση να αποφανθούμε για την κατάσταση παστερίωσης του γάλακτος. Το καφέ χρώμα δηλώνει ότι το γάλα έχει παστεριωθεί, το πράσινο, ότι έχει παστεριωθεί ελαφρώς/μερικώς, ενώ το μπλε, ότι δεν είναι παστεριωμένο.

Το τεστ της Lactognost παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και απαιτεί τη μέγιστη καθαρότητα κατά τη διάρκεια της δοκιμής.



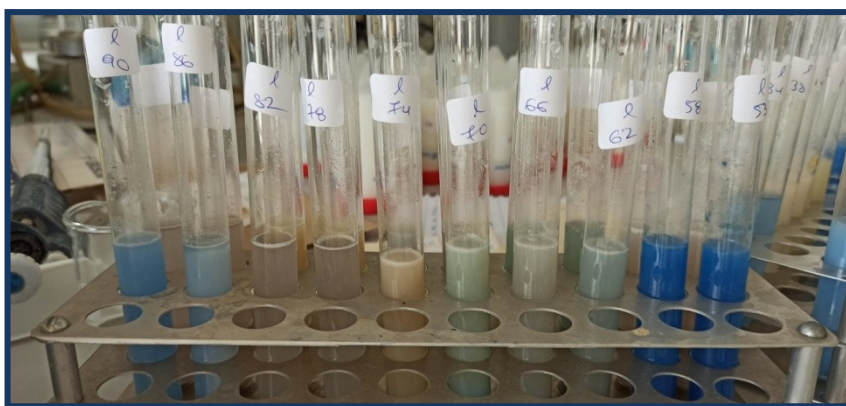
**Εικόνα 24.** Τοποθέτηση των ταμπλετών στους δοκιμαστικούς σωλήνες.



**Εικόνα 25.** Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν στον κλίβανο στους 37 οC για 1 ώρα.



**Εικόνα 26.** Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν στον κλίβανο στους 37 οC για 1 ώρα.



**Εικόνα 27.** Οι δοκιμαστικοί σωλήνες κατεργάστηκαν με τη σκόνη Lactognost III. Το χρώμα κάθε δείγματος αποτελεί ένδειξη της παστερίωσης ή μη του δείγματος. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες ονοματίζονται κωδικοποιημένα.

Η 2<sup>η</sup> μέθοδος που εφαρμόστηκε από τα ποιοτικά tests ήταν η δοκιμή ALP με Phosphatesmo. Για την συγκεκριμένη ανάλυση, υπάρχουν διαθέσιμες οι χαρτοταινίες του kit και δεν απαιτείται κάποιος ιδιαίτερος εξοπλισμός (Εικόνα 28).



**Εικόνα 28.** Δοχείο που περιέχει τις ταινίες μέτρησης PHOSPHATESMO

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή Phosphatesmo παρουσιάζονται στο πίνακα VIII.

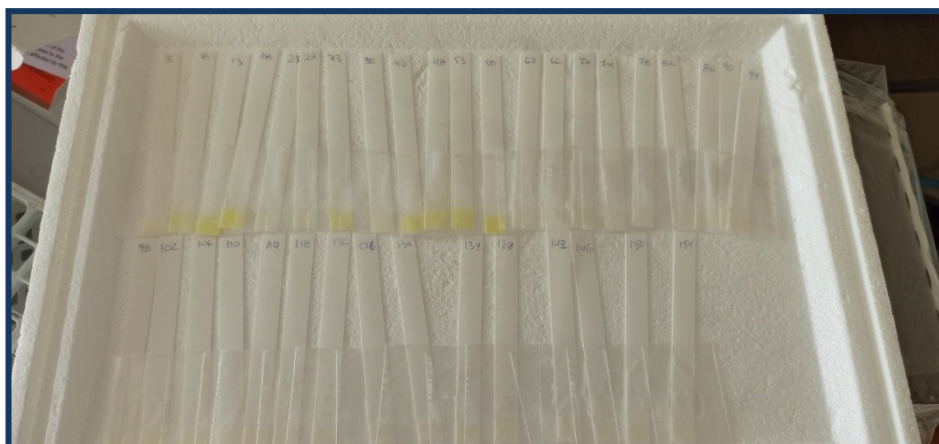
**Πίνακας VIII: Υλικά για τη ποιοτική δοκιμή ALP - Phosphatesmo.**

Υλικά
Ταινίες μέτρησης
Σάκοι πολυαιθυλενίου
Κλίβανος 36°C

Οι ταινίες μέτρησης εμβαπτίστηκαν στο γάλα για λίγα δευτερόλεπτα, και ανακινήθηκε το περίσσιο υγρό. Προκειμένου να αποφευχθεί η ξήρανση της δοκιμαστικής επιφάνειας της ταινίας μέτρησης, τοποθετήθηκε στον κλειστό σάκο PE και για κάθε δοκιμή και επανάληψη πραγματοποιήθηκε χρήση νέας σακούλας για την αποφυγή της επιμόλυνσης. Τέλος, οι δοκιμαστικές ταινίες τοποθετήθηκαν στους 36 °C για μία (1) ώρα. Το όριο ευαισθησίας του kit Phosphatesmo ανέρχεται στο 0.5% νωπού γάλακτος σε παστεριωμένο γάλα. Ακόμη, προτείνεται να φυλάσσεται μακριά από ηλιακή ακτινοβολία και υγρασία, με καλύτερη θερμοκρασία τους +2 έως +8 °C.

Όσον αφορά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, η απουσία αλκαλικής φωσφατάσης εκδηλώνεται με απουσία χρώματος στη δοκιμαστική ταινία. Αντίστοιχα, η παρουσία της, προμηνύεται με το χρωματισμό της ταινίας, κίτρινη (Εικόνα 29).

Η δοκιμή αυτή παρ' όλο που απαιτεί μια ώρα επώαση, θεωρείται σχετικά γρήγορη, διότι τα αποτελέσματα είναι ορατά αμέσως μόλις αφαιρεθούν τα δείγματα από τον κλίβανο.



**Εικόνα 29.** Χρωματισμός ταινίας Phosphatesmo μετά την διατήρηση στους 36 °C για 1 ώρα

Η 3η μέθοδος από τα ποιοτικά τέστ, που εφαρμόστηκε, ήταν η δοκιμή ALP με Kairosafe.

Σημαντικό χαρακτηριστικό για το kit Kairosafe (Lactopast) αποτελεί το γεγονός ότι δεν απαιτείται προετοιμασία θερμικού δείγματος, αφού η δοκιμή λειτουργεί σε εύρος θερμοκρασιών 2-42 °C. Ακόμη, το ίδιο το kit θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2-8 °C. Η ευαισθησία της αγγίζει τα 3,5 mU/L φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται ως η πιο ευαίσθητη δοκιμή στην αγορά. Τέλος, η δοκιμή δεν απαιτεί επώαση, και κατά συνέπεια είναι ταχύτατη.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή Kairosafe παρουσιάζονται στο πίνακα IX.

***Πίνακας IX: Υλικά και Αντιδραστήρια για τη δοκιμή ποιοτική δοκιμή ALP - Kairosafe.***

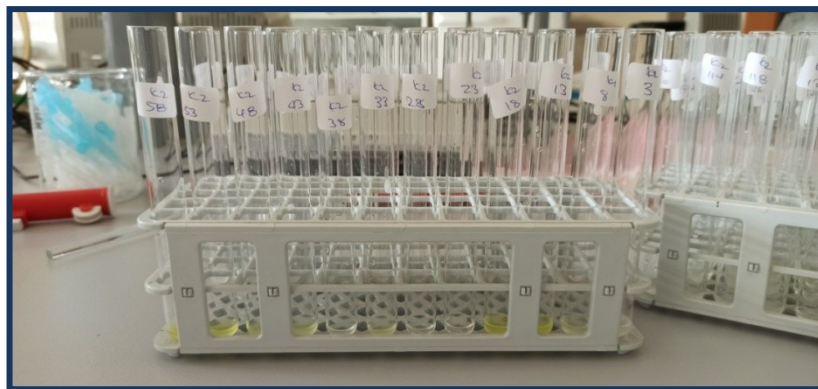
Σκεύη	Αντιδραστήρια
(72) Δοκιμαστικοί σωλήνες	Αντιδραστήριο R2
Σιφόνιο μεταβλητού όγκου 100-1000μL	Αντιδραστήριο R3
Σιφόνιο μεταβλητού όγκου 0,5-10 μL	

Για την εν λόγω ανάλυση, αρχικά φέρθηκαν 400 μl αντιδραστηρίου R2 σε κάθε σωλήνα, και στη συνέχεια 100μl αντιδραστηρίου R3. (Εικόνα 30). Τέλος, έγινε προσθήκη 10μL γάλακτος (το οποίο στις οδηγίες χαρακτηρίζεται σαν R1). Ο δοκιμαστικός σωλήνας ανακινήθηκε για 5 δευτερόλεπτα. Στα επόμενα 5 δευτερόλεπτα, η ανάλυση είχε ολοκληρωθεί και το αποτέλεσμα ήταν εμφανές. Αν δεν αλλάξει το χρώμα, τότε έχει επιτευχθεί σωστή παστερίωση. Σε αντίθετη περίπτωση, όπου το δείγμα χρωματίζεται κίτρινο ή πράσινο, τότε αποτελεί ένδειξη λανθασμένης παστερίωσης (Εικόνα 31) .



**Εικόνα 30.** Τα αντιδραστήρια της δοκιμής Kairosafe.





**Εικόνα 31.** Δοκιμή Kairosafe

### **3.5 Προσδιορισμός δραστηριότητας αλκαλικής φωσφατάσης με ποσοτικές δοκιμές**

Από τα εμπορικά διαθέσιμα ποσοτικά τεστ για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα, τυχαία επιλέχθηκαν 3:

- Zymosnap (Hygiena)
- Paslite (Charm Sciences)
- Fluorophos FLM300

#### **3.5.1 Υλικά-Μέθοδοι**

Η 1<sup>η</sup> μέθοδος που εφαρμόστηκε από τα ποσοτικά τεστ ήταν η δοκιμή ALP με Zymosnap.

Το ZymoSnap™ ALP μετρά τα επίπεδα ενζύμων της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) τόσο στο γάλα, όσο και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η δοκιμή 5 λεπτών επαληθεύει την αποτελεσματικότητα της παστερίωσης ώστε να πληροί τα ρυθμιστικά πρότυπα και αποδεικνύει την απουσία νωπού γάλακτος. Πρόκειται για μια ταχεία μέθοδο που καθορίζει το επίπεδο του ενζύμου ALP μέσω μετατροπής των Relative Light Units (RLUs) σε milliUnits ανά λίτρο (mU/L) ALP σε δείγματα παστεριωμένου γάλακτος. Το ZymoSnap ALP προορίζεται για χρήση με παστεριωμένο υγρό γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Δεν είναι κατάλληλο για χρήση με προϊόντα μεγάλης διάρκειας ζωής ή σταθερά σε περιβάλλον γάλα.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή Lactognost παρουσιάζονται στο πίνακα X.

**Πίνακας X: Υλικά και Αντιδραστήρια για τη δοκιμή ZymoSnap (Hygiena).**

Σκεύη	Αντιδραστήρια
Κλίβανος επώασης στους $37 \pm 1$ ° C	ZymoSnap ALP
Πιπέτα και τιπς για 75μL	ZymoSnap ALP Positive Control Kit (Part No.ZS-ALP-PC)
EnSURE Monitor System (Part No.ENSURE)	

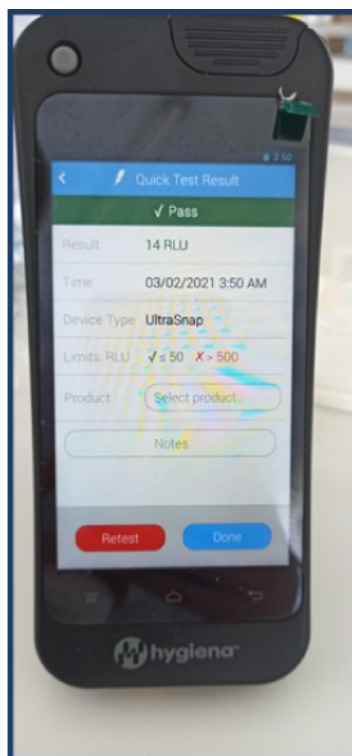
Η αρχή που διέπει τον εν λόγω προσδιορισμό, στηρίζεται στη χρήση μιας μόνο αυτόνομης συσκευής, σε μια απλή διαδικασία. Το δείγμα γάλακτος φέρεται στο σωλήνα ZymoSnap ALP, η συσκευή ενεργοποιείται για να απελευθερώσει το αντιδραστήριο ανίχνευσης και το δείγμα επωάζεται για 5 λεπτά. Η ενζυματική δραστηριότητα ALP μετράται στο σύστημα παρακολούθησης EnSURE™. Το ZymoSnap ALP είναι αρκετά ευαίσθητο ώστε να μετρά κάτω από τα ρυθμιστικά επίπεδα (350mU/L του ALP). Πριν χρησιμοποιηθούν οι συσκευές δοκιμής ZymoSnap ALP, πρέπει να προετοιμαστούν οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες με το κιτ θετικού ελέγχου ZymoSnap ALP (Αρ. Μερών ZS-ALP-PC) προκειμένου να δημιουργηθεί RLU Pass/Fail.

Αρχικά, έπρεπε να εγκλιμαστεί η συσκευή ZymoSnap ALP σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C) για 10 λεπτά, πριν χρησιμοποιηθεί. Έπειτα, ήταν απαραίτητο να σηκωθεί το Snap-Valve από το σωλήνα και να προστεθούν σε αυτόν 75 μL δείγματος. Έπειτα ενεργοποιήθηκε η συσκευή κάμπτοντας το λαμπτήρα προς τα εμπρός και προς τα πίσω για να σπάσει το Snap-Valve και να απελευθερωθεί το αντιδραστήριο στον σωλήνα. Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά  $\pm$  10 δευτερόλεπτα στους  $37 \pm 1$  ° C, και ο σωλήνας ανακινήθηκε για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να αναμιχθούν ικανοποιητικά δείγμα και αντιδραστήριο. Τέλος, ο σωλήνας τοποθετήθηκε στη συσκευή, στο ENSURE και πατήθηκε το "OK" για να ξεκινήσει η μέτρηση. Τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν σε 15 δευτερόλεπτα. Η μέτρηση πραγματοποιείται μόνο μία φορά (Εικόνα 32).

Το Pass/Fail RLU για τον συγκεκριμένο τύπο γάλακτος προσδιορίστηκε με τη χρήση του ZymoSnap ALP Positive Control Kit (No. Part ZS-ALP-PC). Τονίζεται ότι η έξοδος RRL είναι άμεσα ανάλογη της συγκέντρωσης mU/L του υπό μελέτης ενζύμου. Ακόμη, η έξοδος RLU επηρεάζεται από την περιεκτικότητα σε γάλα/λίπος του γάλακτος και τη θερμοκρασία επώασης.

Για τους μάρτυρες της ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκε μόνο το ένα δείγμα από κάθε είδος ζώου.





**Εικόνα 32.** Αποτέλεσμα της ανάλυσης. Το δείγμα χαρακτηρίζεται με την εντολή PASS. Αναγράφονται, επίσης, η ημερομηνία και ώρα εξέτασης, καθώς και τα όρια της ανάλυσης.

Η 2<sup>η</sup> μέθοδος που εφαρμόστηκε από τα ποσοτικά tests ήταν η δοκιμή ALP με PasLite.

Η δοκιμή PasLite είναι μια διεθνώς αποδεκτή μέθοδος που χρησιμοποιείται από γαλακτοκομεία και κατασκευαστές τροφίμων για να επαληθεύσει την ταχεία παστερίωση (HTST) για πολλούς τύπους γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το ρευστό λευκό γάλα, τα αρωματισμένα και μη αρωματισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα στερεά/ημιστερεά γαλακτοκομικά προϊόντα. Στην ουσία, πιστοποιείται η πληρότητα της παστερίωσης του γάλακτος, με την ανίχνευση της αλκαλικής φωσφατάσης στο δείγμα γάλακτος, όπως και στις προαναφερθείσες περιπτώσεις. Η διεργασία ολοκληρώνεται σε τρία (3) μόλις λεπτά, ενώ είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή Paslite παρουσιάζονται στο πίνακα XI.

***Πίνακας XI. Σκεύη, Όργανα και Αντιδραστήρια για τη δοκιμή PasLite.***

Σκεύη	Όργανα	Αντιδραστήρια
Μικροσωλήνες με πώμα (2 ml)	Λουμινόμετρο Charm	Reagent AP
Πιπέτες με tips (100 µl, 5 ml)	Κλίβανος επώασης (35 °C)	Stopping Solution
Σωλήνες Φυγοκέντρωσης με πώμα (50 ml & 15 ml)	Σιφόνιο 100 µl	Calibration Tablets
	Ρυθμιζόμενη πιπέτα 1-5 ml	Microtube Adapter
	Δοχείο 1 ml	Positive AP Control

Κατά την προετοιμασία των προς ανάλυση γαλακτοκομικών δειγμάτων, αναμιγνύονται με τα αντιδραστήρια PasLite και επωάζονται στους 35 °C για τρία (3) λεπτά. Το διάλυμα που προκύπτει, εκπέμπει ακτινοβολία στο ορατό φως, έντασης ευθέως ανάλογης της συγκέντρωσης του ενζύμου σε αυτό.. Το σύστημα Charm novaLUM II-X χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του εκπεμπόμενου φωτός και μετατρέπει τις μετρήσεις φωτός σε ενζυματικές μονάδες. Σύμφωνα με τις νομοθετικές απαιτήσεις των ΗΠΑ και της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αποτελέσματα άνω των 350 mU/L αποτελούν ένδειξη ατελούς παστερίωσης του προϊόντος. Ακόμη, το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι τα 20 mU/L φωσφατάσης (περίπου 0,002% νωπό γάλα). Αυτό είναι πολύ κάτω από το επίπεδο των 350 mU/L (0,1% νωπό γάλα) που απαιτείται από τους περισσότερους οργανισμούς δημόσιας υγείας. Τέλος, η εν λόγω μέθοδος αποτελεί τυποποιημένη ανάλυση για ISO και IDF, ενώ μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί σε πρόγραμμα που εφαρμόζει το σύστημα HACCP.

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία ανάλυσης με το μηχάνημα PasLite της εταιρείας Charm, ακολουθείται η προετοιμασία και βαθμονόμηση, όπως είναι απαραίτητο, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

Επίσης πριν τη δοκιμή γίνεται ο απαραίτητος και αναγκαίος έλεγχος απόδοσης, ο οποίος έχει ως εξής:

Πραγματοποιείται έλεγχος για ένα αρνητικό δείγμα και ένα θετικό μάρτυρα ή 350 mU / L του βαθμονομητή ελέγχονται για να επιβεβαιωθεί ότι τα αντιδραστήρια και ο εξοπλισμός λειτουργούν σωστά.

- ✓ Το αρνητικό δείγμα πρέπει να είναι 5 mU / L ή λιγότερο (15 mU / L ή λιγότερο για προϊόντα με γεύση / αρωματισμένα προϊόντα).
- ✓ Ο θετικός έλεγχος πρέπει να είναι 300 έως 585 mU / L ή ο βαθμονομητής 350 mU / L πρέπει να είναι 247 έως 453 mU / L.

Εάν δεν πληρούνται οι παραπάνω συνθήκες απόδοσης, χρειάζεται επανάληψη του ελέγχου για αρνητικό και θετικό δείγμα.

Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία σύμφωνα με τις οδηγίες. Αρχικά προστέθηκαν 100 μl αντιδραστήριου AP σε κάθε νέο και καθαρό μικροσωλήνα (το πολύ 6 δείγματα). Έπειτα χρησιμοποιήθηκαν οι πιπέτες των 100 μl με τα τιπ, και προστέθηκε το αντιδραστήριο AP, το οποίο στη συνέχεια διανεμήθηκε στο κάτω μέρος του κάθε σωλήνα. Αμέσως μετά προστέθηκαν 100 μl του δείγματος, που βρισκόταν σε θερμοκρασία ψύξης, σε κάθε ένα μικροσωλήνα. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε νέα πιπέτα των 100 μl και νέο τιπ. Ακολούθησε καλή ανακίνηση για 10 δευτερόλεπτα, κάνοντας μια γρήγορη κίνηση εμπρός και πίσω σαν δίνη. Στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν στους 35 °C για 3 λεπτά. Εντός 10 δευτερολέπτων από το τέλος του 3ου λεπτού επώασης, διανεμήθηκε 1,0 ml stopping solution και αφαιρέθηκαν οι μικροσωλήνες από τον κλίβανο, τοποθετήθηκε καπάκι και ανακινήθηκαν για 10 δευτερόλεπτα. Τέλος, όταν και όπου ήταν απαραίτητο, αφαιρέθηκε το καπάκι και συνδέθηκε ο μικροσωλήνας με το δείγμα στον προσαρμογέα μικροσωλήνων. Το nonaLUM ήταν σε όρθια θέση. Έπειτα επιλέχθηκε το κατάλληλο κανάλι και πατήθηκε ENTER. Τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν μετά από 5 δευτερόλεπτα. Η μέτρηση όλων των σωλήνων ολοκληρώθηκε εντός 3 λεπτών από την προσθήκη του Stopping Solution.



**Εικόνα 33.** Τα διαθέσιμα αντιδραστήρια

Αποτελέσματα που ξεπερνούν τα 350 mU/L, καθιστούν το εξεταζόμενο δείγμα ύποπτα θετικό, και απαιτείται ο επανέλεγχός του. Αντίστοιχα, σε αποτελέσματα που ξεπερνούν τα 100 mU/L, θα μπορούσαν να υποδείξουν πιθανά προβλήματα κατά την παστερίωση.

Η 3<sup>η</sup> μέθοδος που εφαρμόστηκε από τα ποσοτικά τέστ ήταν η δοκιμή ALP με Fluorophos FLM300.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή Fluorophos παρουσιάζονται στο πίνακα XII.

***Πίνακας XII: Υλικά και Αντιδραστήρια για τη δοκιμή Fluorophos.***

<b>Υλικά</b>	<b>Όργανα</b>	<b>Αντιδραστήρια</b>
Πιπέτες με τιπς 25-75 µL (100)	Θερμόμετρο	Ρυθμιστικό υπόστρωμα
Κυψελίδες Fluorophos (250)	Συσκευή Fluorophos	Ρυθμιστικό εκχύλισης
Χαρτί εκτυπωτή (5 ρολά )	Vortex	Απιονισμένο νερό
Πιπέτες 25µL		
Πιπέτες 75 µL		
Σύρμα εμβόλου για την πιπέτα των 75 µL		
Καθαριστικά για τις κυψελίδες (50)		
Φίλτρα αντικατάστασης αέρα		
Διπλά φίλτρα διέγερσης (ACP, ALP)		
Σιφώνιο 2 mL και τιπς		

Η ανάλυση Fluorophos ALP είναι (Εικόνα 34) μια γρήγορη δοκιμή για την επαλήθευση της σωστής παστερίωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων, μιας και απαιτούνται μόλις τρία λεπτά για την εμφάνιση του αποτελέσματος. Μπορεί να αναλυθεί ένα δείγμα τη φορά, ενώ η ευαισθησία του προσδιορισμού αγγίζει το 0.003% νωπού γάλακτος σε παστεριωμένο γάλα, από οποιοδήποτε τύπο γάλακτος. Τέλος, πρόκειται για μέθοδο που είναι πιστοποιημένη με ISO (ISO11816-1:IDF 155-1 and ISO11816-2:IDF 155-2), και τα αποτελέσματά της αξιοποιούνται σαν πρότυπα.

Επιπρόσθετα, η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη ειδικότητα, μιας και επιτυγχάνει την εξάλειψη των εσφαλμένων θετικών αποτελεσμάτων. Σημειώνεται ότι το χρώμα του προς ανάλυση δείγματος, ή οι διαφοροποιήσεις στο λιπιδικό προφίλ του δεν επηρεάζουν το αποτέλεσμα. Ακόμη, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί και για την ανάλυση τυριών, χωρίς να απαιτείται η αγορά περαιτέρω οργάνων. Ακόμη, είναι συμβατό με τη μέθοδο HACCP.



**Εικόνα 34.** Δοκιμή αλκαλικής φωσφατάσης με Fluorophos.

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής τα δείγματα διατηρήθηκαν στους  $0,0-4,5^{\circ}\text{C}$

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν όλοι οι έλεγχοι οργάνων και αντιδραστηρίων, αρνητικός έλεγχος και θετικός έλεγχος πριν από την εκτέλεση της ανάλυσης. Έπειτα, χρησιμοποιώντας διανομέα αντιδραστηρίου, σταθερού όγκου ή ηλεκτρονικό σιφώνιο, ή αποστειρωμένο ορολογικό σιφώνιο, διανεμήθηκαν 2,0 mL υποστρώματος σε γυάλινες κυψελίδες 12 x 75 mm. Πριν από τη διανομή πρέπει να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες στις κυψελίδες. Στη συνέχεια ζεστάθηκε το υπόστρωμα στους  $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$  στο μπλοκ θέρμανσης για 20 λεπτά. Εισήχθη ο αριθμός δείγματος και έγινε καλή ανακίνησή του. Το κάθε δείγμα ανακινήθηκε περίπου 25 φορές, με τη βοήθεια vortex.

Για πιπέτες θετικής μετατόπισης με επαναχρησιμοποιούμενα άκρα, πριν χρησιμοποιηθούν οι πιπέτες, ξεπλύθηκαν με νερό και έπειτα το νερό αυτό αποβλήθηκε στα απόβλητα και το εξωτερικό του εμβόλου αφέθηκε να στεγνώσει. Έπειτα τοποθετήθηκε το άκρο της πιπέτας στο δείγμα (όχι πάνω από 1 cm), τραβήχτηκε και εκτινάχτηκε πολλές φορές, και τοποθετήθηκε το δείγμα στο σιφώνιο, κρατώντας το σιφώνιο σε περίπου  $90^{\circ}$  έως τον πάγκο του εργαστηρίου και με το άκρο του περίπου στο επίπεδο των ματιών. Ακολούθησε στέγνωμα του εξωτερικού του άκρου σκουπίζοντας γρήγορα από το σιφώνιο πάνω από το άκρο. Έπρεπε να βεβαιωθεί ότι ο όγκος του δείγματος είναι στο ίδιο επίπεδο με την άκρη και εάν ήταν κοίλο, η δοκιμή έπρεπε να ξανά γίνει.

Για πιπέτες μετατόπισης αέρα με νέο άκρο για κάθε δείγμα, πιάστηκε το έμβολο και τοποθετήθηκε το άκρο στο δείγμα χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες και έπειτα αφαιρέθηκε από το δείγμα. Εάν το πλεονάζον προϊόν κολλούσε στην άκρη, έπρεπε να σκουπιστεί προσεκτικά χωρίς να σκουπιστεί το δείγμα.

Στη συνέχεια διανέμονται 75  $\mu\text{L}$  (ή 25  $\mu\text{L}$ ) δείγματος περίπου 1 cm κάτω από την επιφάνεια του υποστρώματος και με το άκρο ακόμα κάτω από την επιφάνεια, πιάστηκε το έμβολο τρεις φορές στο υπόστρωμα για πλήρη αποβολή του δείγματος. Έπειτα το έμβολο όσο ήταν ακόμα εντελώς πιεσμένο, αφαιρέθηκε από το σωλήνα και πραγματοποιήθηκε ανακίνηση με στροβιλισμό ή με αναστροφή μετά την κάλυψη με Parafilm και ακολούθησε τοποθέτηση της κυψελίδας στο φθορόμετρο.

Τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν σε 3 λεπτά. Όσα δείγματα είχαν  $\geq 350$  mU / L ή περισσότερο ALP είναι ύποπτα θετικά και έπρεπε να επιβεβαιωθούν.

### 3.6 Συγκριτική Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Με την ολοκλήρωση των αναλύσεων, τα αποτελέσματα των 72 δειγμάτων αξιολογήθηκαν συγκριτικά με τη χρήση του προγράμματος Excel Office (Windows 2010).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Περιγραφή δείγματος

Τα δείγματα που συλλέχτηκαν και αναλύθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα XIII

**Πίνακας XIII: Είδος και αριθμός δειγμάτων.**

Είδος γάλακτος	Βουβαλίσιο	Πρόβειο	Γίδινο	Καμήλας	Όνου	Αγελαδινό	Σύνολο
Νωπά δείγματα	6	6	6	6	6	6	24
Δείγματα από	6	6	6	6	6	6	24
Δείγματα από ταχεία	6	6	6	6	6	6	24
Σύνολο							72

### 4.2. Μικροβιολογικά αποτελέσματα

#### 4.2.1. OMX

Για να υπολογίσουμε τον αριθμό των μικροοργανισμών σε cfu/ml χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$N = \Sigma c / (V \times 1,1 \times d)$$

Όπου :

N: ο αριθμός των μικροοργανισμών, που βρίσκονται στο εξεταζόμενο δείγμα και υπολογίζεται ως ο μέσος όρος από 2 διαδοχικές αραιώσεις

Σς: είναι το άθροισμα των αποικιών που απαριθμήθηκαν σε 2 τριβλία τα οποία λήφθηκαν από 2 διαδοχικές αραιώσεις, τουλάχιστον ένα εκ των οποίων περιέχει το ελάχιστο 10 αποικίες,

V: είναι ο όγκος του εμβολίου που τοποθετήθηκε σε κάθε τριβλίο (1ml)

d: είναι η αραιώση που αντιστοιχεί στην 1<sup>η</sup> αραιώση που λήφθηκε

Τα αποτελέσματα καταμέτρησης της OMX στα αναλυθέντα δείγματα παρουσιάζονται στον πίνακα XIV, που ακολουθεί.

***Πίνακας XIV: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα OMX σε cfu/ml***

	Αριθμός	Νωπό	HTST	LTLT
<b>Γίδινο 1</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$>3 \times 10^6$	$5,82 \times 10^4$	$7,18 \times 10^3$
	<b>2<sup>η</sup></b>	$>3 \times 10^6$	$5,82 \times 10^4$	$10,27 \times 10^3$
<b>Γίδινο 2</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$>3 \times 10^6$	655	$14,64 \times 10^5$
	<b>2<sup>η</sup></b>	$>3 \times 10^6$	$1,32 \times 10^3$	$11,36 \times 10^5$
<b>Πρόβειο 1</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$>3 \times 10^6$	45,5	381
	<b>2<sup>η</sup></b>	$>3 \times 10^6$	199	418
<b>Πρόβειο 2</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$>3 \times 10^6$	$2,05 \times 10^3$	373
	<b>2<sup>η</sup></b>	$>3 \times 10^6$	$1,73 \times 10^3$	318
<b>Καμήλας 1</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$6,18 \times 10^4$	$3,55 \times 10^3$	$5,27 \times 10^3$
	<b>2<sup>η</sup></b>	$6,24 \times 10^4$	$3,36 \times 10^3$	682
<b>Καμήλας 2</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$3 \times 10^4$	$1,43 \times 10^3$	27,3
	<b>2<sup>η</sup></b>	$3 \times 10^4$	945	<10
<b>Ονόγαλα 1</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$5 \times 10^3$	151	218
	<b>2<sup>η</sup></b>	$5,18 \times 10^3$	97,27	290
<b>Ονόγαλα 2</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$5,82 \times 10^3$	509	<10
	<b>2<sup>η</sup></b>	$5,64 \times 10^3$	355	0
<b>Βουβαλίσιο 1</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$2,5 \times 10^5$	$3,73 \times 10^4$	$1,27 \times 10^5$
	<b>2<sup>η</sup></b>	$2,19 \times 10^5$	$3,27 \times 10^4$	$1,18 \times 10^5$
<b>Βουβαλίσιο 2</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$2,59 \times 10^5$	$3,73 \times 10^4$	764
	<b>2<sup>η</sup></b>	$2,87 \times 10^5$	$4,45 \times 10^4$	$1,17 \times 10^3$
<b>Αγελαδινό 1</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$15,18 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$2,45 \times 10^4$
	<b>2<sup>η</sup></b>	$15,90 \times 10^4$	$1,55 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$
<b>Αγελαδινό 2</b>	<b>1<sup>η</sup></b>	$23,45 \times 10^4$	$1,64 \times 10^4$	$1,37 \times 10^4$
	<b>2<sup>η</sup></b>	$25,55 \times 10^4$	$1,55 \times 10^4$	$2,09 \times 10^4$

Όπως ήταν αναμενόμενο, η OMX στα περισσότερα νωπά διαθέσιμα δείγματα όσον αφορά τις πρώτες αραιώσεις ήταν μη μετρήσιμη. Αυτό άλλαξε μετά τη δεύτερη αραιώση που διενεργείται, με εξαίρεση το πρόβειο και το γίδινο γάλα, στα οποία πραγματοποιήθηκαν 6 και 8 αραιώσεις αντίστοιχα αλλά τα αποτελέσματα ήταν και πάλι μη μετρήσιμα. Αυτό σημαίνει πως τα δύο αυτά είδη δεν φυλάχθηκαν αμέσως μετά την άλμεξη στις κατάλληλες θερμοκρασίες, ή δεν λήφθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση του δείγματος από εξωτερικούς παράγοντες.



Επίσης, τα δείγματα στα οποία παρατηρείται η μικρότερη ποσότητα OMX, έπειτα από τα δύο είδη παστεριώσεων είναι αυτά του όνου και της καμήλας και στη συνέχεια ακολουθεί το πρόβειο. Άρα επιτεύχθηκε σωστή παστερίωση. Αντίθετα, το βουβαλίσιο γάλα κι έπειτα το αγελαδινό είναι τα δύο είδη που χρειάστηκαν τις περισσότερες αραιώσεις για να μειωθεί και να είναι μετρήσιμη και εντός ορίων η OMX. Τέλος, όσον αφορά το γίδινο γάλα, φαίνεται πως ενώ το πρώτο δείγμα παστεριώθηκε σωστά με τη βραδεία παστερίωση και ελαττώθηκε ταχύτατα η OMX, το δεύτερο δείγμα, παστεριώθηκε καλύτερα με την ταχεία μέθοδο παστερίωσης.

#### 4.2.2 Εντεροβακτηριοειδή

Τα αποτελέσματα καταμέτρησης των Enterobacteriaceae στα αναλυθέντα δείγματα παρουσιάζονται στον πίνακα XV.

**Πίνακας XV:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα Enterobacteriaceae σε cfu/ml

	Αριθμός	Νωπό	HTST	LTLT
Γίδινο 1	1 <sup>η</sup>	4,64 x 10 <sup>3</sup>	0	0
	2 <sup>η</sup>	4,45 x 10 <sup>3</sup>	0	0
Γίδινο 2	1 <sup>η</sup>	8,36 x 10	0	0
	2 <sup>η</sup>	8,73 x 10 <sup>3</sup>	0	0
Πρόβειο 1	1 <sup>η</sup>	1,45 x 10 <sup>4</sup>	0	0
	2 <sup>η</sup>	1,66 x 10 <sup>4</sup>	0	0
Πρόβειο 2	1 <sup>η</sup>	1,18 x 10 <sup>4</sup>	0	0
	2 <sup>η</sup>	1,09 x 10 <sup>4</sup>	0	0
Καμήλας 1	1 <sup>η</sup>	0	0	0
	2 <sup>η</sup>	0	0	0
Καμήλας 2	1 <sup>η</sup>	0	0	0
	2 <sup>η</sup>	0	0	0
Ονόγαλα 1	1 <sup>η</sup>	11,82	0	0
	2 <sup>η</sup>	<10	0	0
Ονόγαλα 2	1 <sup>η</sup>	10	0	0
	2 <sup>η</sup>	<10	0	0
Βουβαλίσιο 1	1 <sup>η</sup>	2,27 x 10 <sup>4</sup>	0	0
	2 <sup>η</sup>	6,45 x 10 <sup>3</sup>	0	0
Βουβαλίσιο 2	1 <sup>η</sup>	2,64 x 10 <sup>3</sup>	0	0
	2 <sup>η</sup>	4,64 x 10 <sup>3</sup>	0	0
Αγελαδινό 1	1 <sup>η</sup>	16,36	0	0
	2 <sup>η</sup>	30	0	0
Αγελαδινό 2	1 <sup>η</sup>	47,27	0	0
	2 <sup>η</sup>	22,73	0	0

Όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε, στα παστεριωμένα δείγματα δεν ανιχνεύτηκε κανένα εντεροβακτηρίδιο.

Όπως παρατηρήθηκε και με την OMX, τα δείγματα που προέρχονται από όνο και καμήλα παρουσιάζουν τις λιγότερες αποικίες, και ειδικότερα μετά από τις πρώτες κιόλας αραιώσεις δεν υπάρχουν αποικίες. Αντίθετα, στα υπόλοιπα είδη εμφανίζονται όλων των ειδών οι αποικίες, και είναι μηδενικές μόνο στην τελευταία αραιώση. Οι αποικίες που επικρατούν σε όλα ανεξαιρέτως τα δείγματα είναι οι μικρές στρόγγυλες. Έπειτα από τις ανακαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των βακτηρίων, τα αναλυτικά που έδωσε το MALDI TOF – MS φαίνονται στον πίνακα XVI.

Όπως προκύπτει από τον παρακάτω πίνακα, οι συνηθέστεροι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται στο νωπό γάλα είναι οι *Pantonea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas koreensis* και *Pseudomonas fulva*, και σε ακόμη λιγότερες περιπτώσεις οι *Pseudomonas corrugata*, *Raoultella ornithinolytica* και *Hafnia alvei*. Η επικρατέστερη αντιστοίχιση στην αποικία αναγράφεται στην τρίτη στήλη σαν «best match» (καλύτερη αντιστοίχιση), ενώ στην πέμπτη στήλη, με την επιγραφή «second best match» (δευτερεύουσα καλύτερη αντιστοίχιση) κυρίως γίνεται λόγος για μικρόβια που ανήκουν στο ίδιο είδος, και πιθανά σε διαφορετικά γένη. Αυτό οφείλεται στην ομοιότητα που εκφέρουν οι αποικίες μεταξύ τους, εξωτερικά.

## Πίνακας XVI. αποτελέσματα Maldi

### Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<a href="#">A1</a> (++) (A)	1 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	2.185	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	2.093
<a href="#">A2</a> (-) (C)	2 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">A3</a> (+) (B)	3 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.870	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.858
<a href="#">A4</a> (++) (C)	4 (standard)	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	2.260	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	2.216
<a href="#">A5</a> (++) (A)	5 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	2.128	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	2.081
<a href="#">A6</a> (++) (C)	6 (standard)	<a href="#">Klebsiella oxytoca</a>	2.332	<a href="#">Klebsiella oxytoca</a>	2.292
<a href="#">A7</a> (++) (C)	7 (standard)	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	2.131	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	2.122
<a href="#">A8</a> (++) (A)	8 (standard)	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	2.219	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	2.145

Result overview table—continued on next page

Result overview table—continued from previous page					
Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<a href="#">C1</a> (+) (B)	25 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.871	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.733
<a href="#">C2</a> (-) (C)	26 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">C3</a> (+) (C)	27 (standard)	<a href="#">Klebsiella oxytoca</a>	1.895	<a href="#">Faecalibacterium prausnitzii</a>	1.892
<a href="#">C4</a> (+) (B)	28 (standard)	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	1.905	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	1.874
<a href="#">C5</a> (++) (A)	29 (standard)	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	1.823	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	1.798
<a href="#">C6</a> (++) (C)	30 (standard)	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	2.205	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	2.095
<a href="#">C7</a> (-) (C)	31 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">C8</a> (++) (A)	32 (standard)	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	1.727	<a href="#">Enterobacter cloacae</a>	1.667
<a href="#">C9</a> (-) (C)	33 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">C10</a> (++) (A)	34 (standard)	<a href="#">Escherichia coli</a>	1.885	<a href="#">Escherichia coli</a>	1.829
<a href="#">C11</a> (++) (A)	35 (standard)	<a href="#">Escherichia coli</a>	1.875	<a href="#">Escherichia coli</a>	1.805
<a href="#">C12</a> (-) (C)	36 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">D1</a> (+) (B)	37 (standard)	<a href="#">Pseudomonas fluorescens</a>	1.792	not reliable identification	0.000
<a href="#">D2</a> (++) (A)	38 (standard)	<a href="#">Pseudomonas koreensis</a>	1.870	<a href="#">Pseudomonas corrugata</a>	1.850
<a href="#">D3</a> (-) (C)	39 (standard)	<a href="#">Klebsiella oxytoca</a>	1.824	<a href="#">Klebsiella oxytoca</a>	1.821
<a href="#">D4</a> (+) (B)	40 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.997	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.981

Result overview table—continued on next page

Result overview table—continued from previous page					
Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<a href="#">A9</a> (-) (C)	9 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">A10</a> (++) (A)	10 (standard)	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.273	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.233
<a href="#">A11</a> (++) (A)	11 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.861	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.802
<a href="#">A12</a> (-) (C)	12 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">B1</a> (++) (A)	13 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.861	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.801
<a href="#">B2</a> (++) (A)	14 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	2.274	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	2.273
<a href="#">B3</a> (++) (A)	15 (standard)	<a href="#">Hafnia alvei</a>	2.073	<a href="#">Hafnia alvei</a>	2.069
<a href="#">B4</a> (++) (C)	16 (standard)	<a href="#">Klebsiella oxytoca</a>	1.751	<a href="#">Faecalibacterium prausnitzii</a>	1.702
<a href="#">B5</a> (++) (A)	17 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.830	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.823
<a href="#">B6</a> (++) (A)	18 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.861	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.850
<a href="#">B7</a> (++) (A)	19 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.823	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.818
<a href="#">B8</a> (+) (B)	20 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	1.827	not reliable identification	0.000
<a href="#">B9</a> (++) (A)	21 (standard)	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	2.073	<a href="#">Pantoea agglomerans</a>	2.040
<a href="#">B10</a> (-) (C)	22 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">B11</a> (-) (C)	23 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">B12</a> (-) (C)	24 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000

Result overview table—continued on next page

Result overview table—continued from previous page					
Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<a href="#">D5</a> (-) (C)	41 (standard)	no peaks found	0.000	no peaks found	0.000
<a href="#">D6</a> (++) (A)	42 (standard)	<a href="#">Pseudomonas koreensis</a>	1.873	<a href="#">Pseudomonas corrugata</a>	1.835
<a href="#">D7</a> (++) (A)	43 (standard)	<a href="#">Pseudomonas koreensis</a>	1.888	<a href="#">Pseudomonas koreensis</a>	1.912
<a href="#">D8</a> (++) (A)	44 (standard)	<a href="#">Pseudomonas koreensis</a>	1.824	<a href="#">Pseudomonas koreensis</a>	1.886
<a href="#">D9</a> (++) (A)	45 (standard)	<a href="#">Pseudomonas koreensis</a>	1.943	<a href="#">Pseudomonas koreensis</a>	1.927
<a href="#">D10</a> (++) (A)	46 (standard)	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.269	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.131
<a href="#">D11</a> (++) (A)	47 (standard)	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.186	<a href="#">Escherichia coli</a>	1.820
<a href="#">D12</a> (++) (A)	48 (standard)	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.090	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.088
<a href="#">E1</a> (++) (A)	49 (standard)	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.354	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.299

### 4.3. Ποιοτικές δοκιμές Αλκαλικής Φωσφατάσης

#### 4.3.1. *Lactognost*

Στον πίνακα XVII αναφέρονται τα αποτελέσματα και των δύο επαναλήψεων, εφόσον συμπίπτουν. Συγκεκριμένα, αναφέρεται αν είναι θετικά (+), αρνητικά(-), αμφίβολα (~) τα αποτελέσματα που αφορούν στην ALP, καθώς και το χρώμα που άλλαξε το κάθε δείγμα με την προσθήκη των κατάλληλων αντιδραστηρίων.

***Πίνακας XVII. : Πίνακας αποτελεσμάτων από το κιτ Lactognost.***

	<b>Νωπό</b>	<b>HTST</b>	<b>LTLT</b>
<b>Γίδινο 1</b>	Μπλε (+)	Πράσινο (~)	Πράσινο (~)
<b>Γίδινο 2</b>	Μπλε (+)	Πράσινο (~)	Πράσινο (~)
<b>Πρόβειο 1</b>	Μπλε (+)	Πράσινο -καφέ (~)	Καφέ (-)
<b>Πρόβειο 2</b>	Μπλε (+)	Καφέ (-)	Καφέ (-)
<b>Καμήλας 1</b>	Μπλε (+)	Μπλε (+)	Μπλε (+)
<b>Καμήλας 2</b>	Μπλε (+)	Μπλε (+)	Μπλε (+)
<b>Ονόγαλα 1</b>	Μπλε (+)	Καφέ (-)	Καφέ –μπλε (~)
<b>Ονόγαλα 2</b>	Μπλε (+)	Καφέ (-)	Καφέ –μπλε (~)
<b>Βουβαλίσιο 1</b>	Μπλε (+)	Καφέ (-)	Καφέ (-)
<b>Βουβαλίσιο 2</b>	Μπλε (+)	Καφέ (-)	Καφέ (-)
<b>Αγελαδινό 1</b>	Μπλε (+)	Πράσινο μπλε (~)	Πράσινο -καφέ (~)
<b>Αγελαδινό 2</b>	Μπλε (+)	Πράσινο μπλε (~)	Πράσινο -καφέ (~)

#### 4.3.2. Phospatesmo

Στον πίνακα XVIII αναφέρονται τα αποτελέσματα και των δύο επαναλήψεων, εφόσον συμπίπτουν. Συγκεκριμένα, αναφέρεται αν είναι θετικά (+) ή αρνητικά(-), τα αποτελέσματα που αφορούν στην ALP, καθώς και το χρώμα που άλλαξε το κάθε δείγμα με την προσθήκη των κατάλληλων αντιδραστηρίων.

**Πίνακας XVIII. : Πίνακας αποτελεσμάτων από το κιτ Phosphatesmo.**

	<b>Νωπό</b>	<b>HTST</b>	<b>LTLT</b>
<b>Γίδινο 1</b>	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Γίδινο 2</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Πρόβειο 1</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Πρόβειο 2</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Καμήλας 1</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Καμήλας 2</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Ονόγαλα 1</b>	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Ονόγαλα 2</b>	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Βουβαλίσιο 1</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Βουβαλίσιο 2</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Αγελαδινό 1</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Αγελαδινό 2</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)

#### 4.3.3 Kairosafe

Στον πίνακα XIX αναφέρονται τα αποτελέσματα και των δύο επαναλήψεων, εφόσον συμπίπτουν. Συγκεκριμένα, αναφέρεται αν είναι θετικά (+) ή αρνητικά(-), τα αποτελέσματα που αφορούν στην ALP, καθώς και το χρώμα που άλλαξε το κάθε δείγμα με την προσθήκη των κατάλληλων αντιδραστηρίων.

***Πίνακας XIX : Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Kairosafe.***

	<b>Νωπό</b>	<b>HTST</b>	<b>LTLT</b>
<b>Γίδινο 1</b>	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Γίδινο 2</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Πρόβειο 1</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Πρόβειο 2</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Καμήλας 1</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Καμήλας 2</b>	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Ονόγαλα 1</b>	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Ονόγαλα 2</b>	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Βουβαλίσιο 1</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Βουβαλίσιο 2</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Αγελαδινό 1</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)
<b>Αγελαδινό 2</b>	Κίτρινο (+)	Άχρωμο (-)	Άχρωμο (-)



## 4.4. Ποσοτικές δοκιμές Αλκαλικής Φωσφατάσης

### 4.4.1 Zymosnap

Στον πίνακα XX αναφέρονται τα αποτελέσματα και των δύο επαναλήψεων. Συγκεκριμένα , αναφέρεται αν είναι θετικά (+) ή αρνητικά(-),τα αποτελέσματα που αφορούν στην ALP,ενώ στον πίνακα XXI φαίνονται αναλυτικά τα αριθμητικά αποτελέσματα .

**Πίνακας XX. : Πίνακας αποτελεσμάτων από το κιτ Zymosnap.**

	Νωπό	HTST	LTLT
Γίδινο 1	(+)	(-)	(-)
Γίδινο 2	(+)	(-)	(-)
Πρόβειο 1	(+)	(-)	(-)
Πρόβειο 2	(+)	(-)	(-)
Καμήλας 1	(+)	(+)	(+)
Καμήλας 2	(+)	(+)	(+)
Ονόγαλα 1	(+)	(-)	(-)
Ονόγαλα 2	(+)	(-)	(-)
Βουβαλίσιο 1	(+)	(-)	(-)
Βουβαλίσιο 2	(+)	(-)	(-)
Αγελαδινό 1	(+)	(+)	(-)
Αγελαδινό 2	(+)	(+)	(-)

**Πίνακας XXI. : Αναλυτικός Πίνακας αποτελεσμάτων από το κιτ Zymosnap.**

	Νωπό	HTST	LTLT
Γίδινο 1	11557,5	171	223
Γίδινο 2	12458,5	2	261,5
Πρόβειο 1	20000	722,5	93,5
Πρόβειο 2	20000	14	22,93
Καμήλας 1	20000	2255,5	1921,5
Καμήλας 2	4249	1754,5	1911
Ονόγαλα 1	1251,5	9	15
Ονόγαλα 2	2075,5	7,5	22
Βουβαλίσιο 1	3631,5	11	3
Βουβαλίσιο 2	13495	85	13,5
Αγελαδινό 1	20000	2342	26
Αγελαδινό 2	20000	1277	16

#### 4.4.2 Paslite

Στον πίνακα XXII αναφέρονται τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου κιτ. Συγκεκριμένα , αναφέρεται αν είναι θετικά (+) ,αρνητικά(-) ή αμφίβολα (~) τα αποτελέσματα που αφορούν στην ALP ενώ στον πίνακα XXIII φαίνονται αναλυτικά τα αριθμητικά αποτελέσματα .

**Πίνακας XXII. : Πίνακας αποτελεσμάτων από το κιτ Paslite.**

	Νωπό	HTST	LTLT
Γίδινο 1	(+)	(-)	(-)
Γίδινο 2	(+)	(-)	(-)
Πρόβειο 1	(+)	(-)	(-)
Πρόβειο 2	(+)	(-)	(-)
Καμήλας 1	(+)	(~)	(~)
Καμήλας 2	(+)	(~)	(-)
Ονόγαλα 1	(-)	(-)	(-)
Ονόγαλα 2	(-)	(-)	(-)
Βουβαλίσιο 1	(+)	(-)	(-)
Βουβαλίσιο 2	(+)	(-)	(-)
Αγελαδινό 1	(+)	(+)	(-)
Αγελαδινό 2	(+)	(+)	(~)

**Πίνακας XXIII. : Αναλυτικός Πίνακας αποτελεσμάτων από το κιτ Paslite.**

	Νωπό	HTST	LTLT
Γίδινο 1	2931	34,13	12,99
Γίδινο 2	2521	9,2	16,12
Πρόβειο 1	2766	162	14,92
Πρόβειο 2	2851	25,37	90
Καμήλας 1	781	180,1	186,3
Καμήλας 2	494	146	63,71
Ονόγαλα 1	111	20,97	11,67
Ονόγαλα 2	93	7,52	30,6
Βουβαλίσιο 1	5304	8,11	22,87
Βουβαλίσιο 2	5325	19,52	46,12
Αγελαδινό 1	4985	603,2	30,54
Αγελαδινό 2	5102	488,6	159,64

#### 4.4.3 Fluorophos

Στον πίνακα XXIV αναφέρονται τα αποτελέσματα και των δύο επαναλήψεων. Συγκεκριμένα , αναφέρεται αν είναι θετικά (+) , ή αρνητικά(-) τα αποτελέσματα που αφορούν στην ALP ενώ στον πίνακα XXV φαίνονται αναλυτικά τα αριθμητικά αποτελέσματα.

**Πίνακας XXIV. : Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Fluorophos.**

	<b>Νωπό</b>	<b>HTST</b>	<b>LTLT</b>
<b>Γίδινο 1</b>	(+)	(-)	(-)
<b>Γίδινο 2</b>	(+)	(-)	(+)
<b>Πρόβειο 1</b>	(+)	(+)	(+)
<b>Πρόβειο 2</b>	(+)	(-)	(-)
<b>Καμήλας 1</b>	(+)	(+)	(+)
<b>Καμήλας 2</b>	(+)	(+)	(+)
<b>Ονόγαλα 1</b>	(+)	(-)	(-)
<b>Ονόγαλα 2</b>	(+)	(-)	(-)
<b>Βουβαλίσιο 1</b>	(+)	(-)	(-)
<b>Βουβαλίσιο 2</b>	(+)	(-)	(-)
<b>Αγελαδινό 1</b>	(+)	(+)	(-)
<b>Αγελαδινό 2</b>	(+)	(+)	(-)

**Πίνακας XXV. : Αναλυτικός Πίνακας αποτελεσμάτων από το kit Fluorophos.**

	<b>Νωπό</b>	<b>HTST</b>	<b>LTLT</b>
<b>Γίδινο 1</b>	Overranged	172,4	299,05
<b>Γίδινο 2</b>	Overranged	153,8	409,15
<b>Πρόβειο 1</b>	Overranged	1006,95	379,05
<b>Πρόβειο 2</b>	Overranged	83,2	180,2
<b>Καμήλας 1</b>	10660	6102,5	7736,5
<b>Καμήλας 2</b>	4386	4879,5	2537,1
<b>Ονόγαλα 1</b>	2167,9	66,65	100,9
<b>Ονόγαλα 2</b>	2060,4	16,55	123,45
<b>Βουβαλίσιο 1</b>	Overranged	46,2	54,95
<b>Βουβαλίσιο 2</b>	Overranged	209,6	37,25
<b>Αγελαδινό 1</b>	Overranged	10499,5	71,95
<b>Αγελαδινό 2</b>	Overranged	2150,7	58,15

#### 4.5. Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα από την σύγκριση των διαφόρων μεθόδων παρουσιάζονται στον Πίνακα XXVI.

**Πίνακας XXVI: Συγκεντρωτικός συγκριτικός πίνακας και των 6 κιτ**

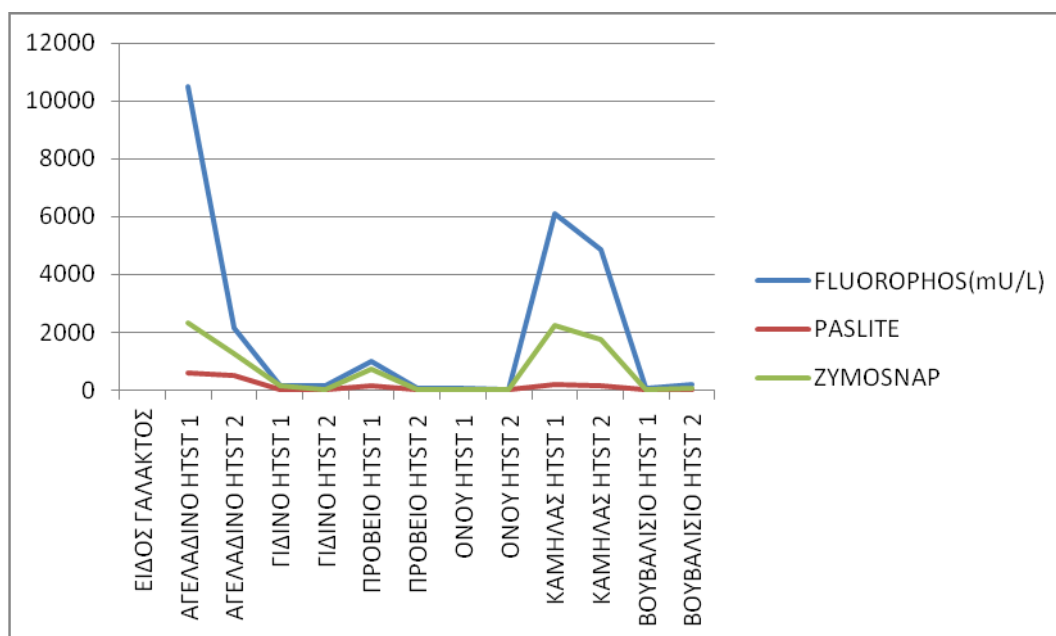
ΜΕΘΟΔΟΣ/ ΕΙΔΟΣ ΓΑΛ:	ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΚΙΤ ALP			ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΙΤ ALP		
	FLUORO PHOS	PAS LITE	ZYMO SNAP	KAIRO SAFE	PHOSPHA TESMO	LACTO GNOST
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ ΝΩΠΟ 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ ΝΩΠΟ 2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ HTST 1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ HTST 2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ LTLT 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ LTLT 2	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΓΙΑΙΝΟ ΝΩΠΟ 1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
ΓΙΑΙΝΟ ΝΩΠΟ 2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
ΓΙΑΙΝΟ HTST 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΓΙΑΙΝΟ HTST 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΓΙΑΙΝΟ LTLT 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
ΓΙΑΙΝΟ LTLT 2	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
ΠΡΟΒΕΙΟ ΝΩΠΟ 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ΠΡΟΒΕΙΟ ΝΩΠΟ 2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ΠΡΟΒΕΙΟ HTST 1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(~)
ΠΡΟΒΕΙΟ HTST 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΠΡΟΒΕΙΟ LTLT 1	(~)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΠΡΟΒΕΙΟ LTLT 2	(~)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)

ΜΕΘΟΔΟΣ/ ΕΙΔΟΣ ΓΑΛ:	ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΚΙΤ ALP			ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΙΤ ALP		
	FLUORO PHOS	PAS LITE	ZYMO SNAP	KAIRO SAFE	PHOSPHA TESMO	LACTO GNOST
ΟΝΟΥ ΝΩΠΟ 1	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
ΟΝΟΥ ΝΩΠΟ 2	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
ΟΝΟΥ HTST 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΟΝΟΥ HTST 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΟΝΟΥ LTLT1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΟΝΟΥ LTLT2	(~)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΚΑΜΗΛΑΣ ΝΩΠΟ 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ΚΑΜΗΛΑΣ ΝΩΠΟ 2	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
ΚΑΜΗΛΑΣ HTST 1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
ΚΑΜΗΛΑΣ HTST 2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
ΚΑΜΗΛΑΣ LTLT 1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
ΚΑΜΗΛΑΣ LTLT 2	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ ΝΩΠΟ 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ ΝΩΠΟ 2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ HTST 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ HTST 2	(~)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ LTLT1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)
ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ LTLT 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(~)

Με κόκκινο επισημαίνονται οι τιμές που υπερβαίνουν τα όρια και υποδεικνύουν τα δείγματα που έχουν παστεριωθεί ατελώς. Ενώ με μπλε επισημαίνονται οι τιμές που βρίσκονται κοντά στο όρια που αφορούν το κάθε kit από τις διαφορετικές εταιρείες.

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα λοιπόν, στα 4 από τα 6 kit, τα οποία μας δίνουν πιο ακριβή και πιο συγκεκριμένα αποτελέσματα, φαίνεται πως τα αποτελέσματα συμφωνούν μεταξύ τους, και το γάλα καμήλας είναι αυτό που με δυσκολία παστεριώνεται σωστά και η αλκαλική φωσφατάση δεν καταστρέφεται πλήρως. Το αμέσως επόμενο δείγμα είναι το αγελαδινό, που όπως προαναφέραμε, ήταν αναμενόμενο, διότι τα δύο αυτά είδη έχουν τόσο παρόμοιες συμπεριφορές στο περιβάλλον όσο και παρόμοια σύσταση.

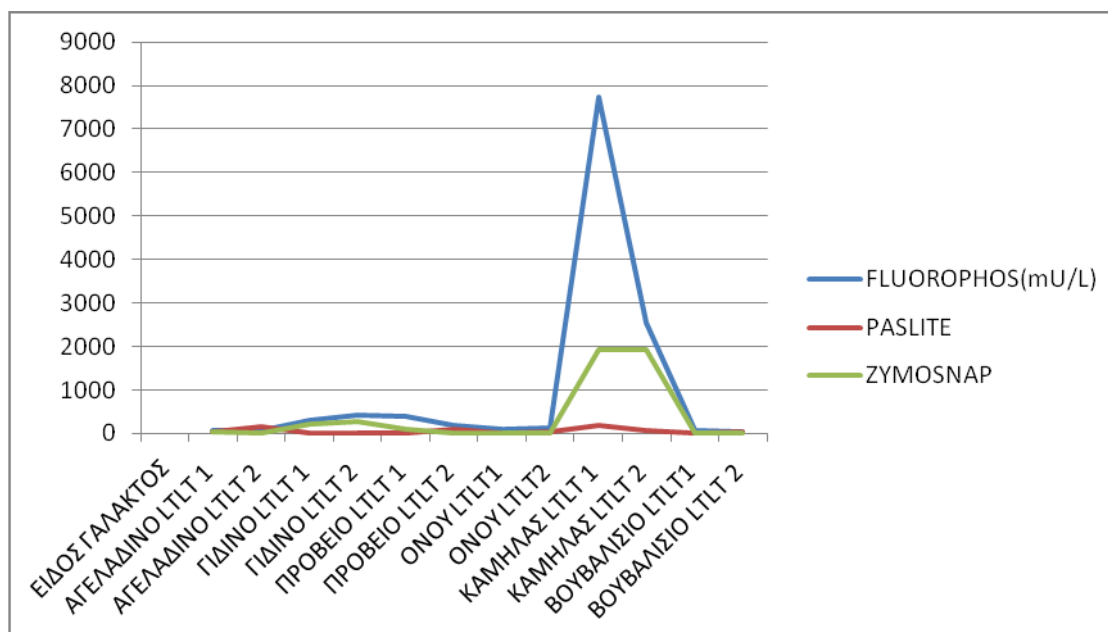
Έπειτα τα υπόλοιπα δείγματα φαίνεται να βρίσκονται σε πιο οριακές καταστάσεις.



**Διάγραμμα Ι :** Σύγκριση ποσοτικών kit για τα παστεριωμένα δείγματα με την ταχεία μέθοδο

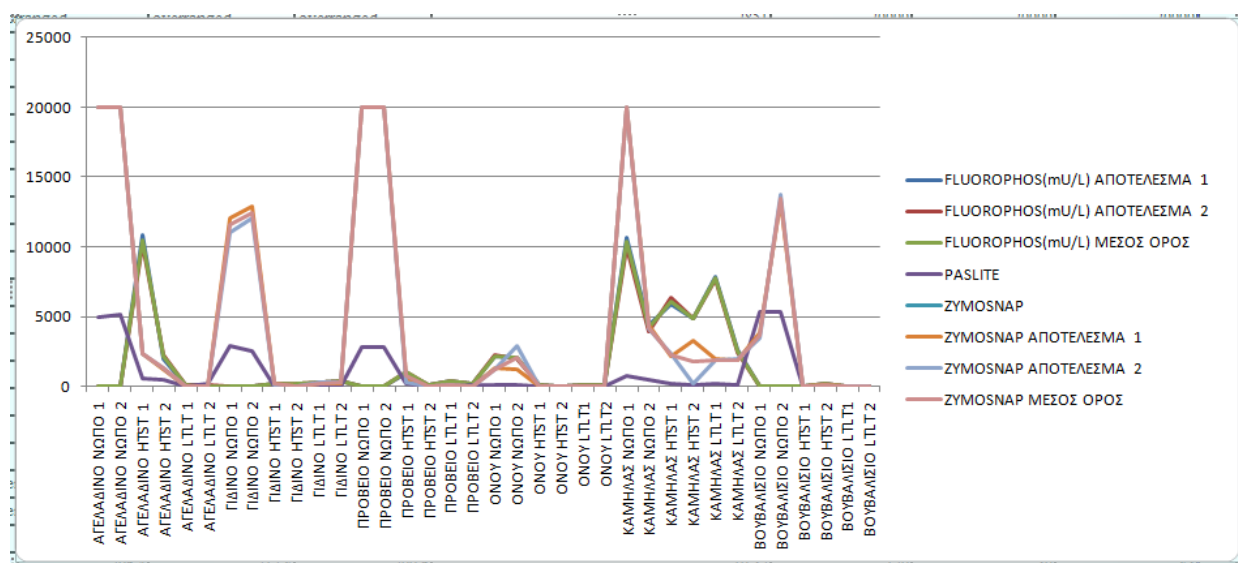
Όπως διακρίνεται στο παραπάνω γράφημα το kit της εταιρείας paslite μας δίνει τις χαμηλότερες τιμές έπειτα από την HTST παστερίωση.





**Διάγραμμα II :** Σύγκριση ποσοτικών κιτ για τα παστεριωμένα δείγματα με την Βραδεία μέθοδο

Όπως διακρίνεται στο παραπάνω γράφημα και σε αυτή την περίπτωση της LTLT παστερίωσης, το κιτ της εταιρείας paslite μας δίνει τις χαμηλότερες τιμές.



**Διάγραμμα III :** Σύγκριση ποσοτικών κιτ συγκεντρωτικά

Φαίνεται πως στο γάλα της καμήλας κλονίζεται η ευαισθησία των κιτ, διότι η ποσότητα της αλκαλικής φωσφατάσης δεν ελαττώνεται στο αναμενόμενο αποτέλεσμα.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προκειμένου να αξιολογηθεί συγκριτικά η αξιοπιστία της δοκιμής της αλκαλικής φωσφατάσης για τα μη αγελαδινά γάλατα, αξιοποιώντας τρία ποιοτικά και τρία ποσοτικά κιτ, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τα επιλεγμένα δείγματα ονογάλακτος, γάλακτος καμήλας, βουβάλου, προβάτου και αίγας. Τα κιτ που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα στη βιομηχανία γάλακτος και ως εκ τούτου θεωρούνται αντιπροσωπευτικά. Τα δείγματα αφορούσαν τα περισσότερα από τα μη αγελαδινά γάλατα που καταναλώνονται παγκοσμίως. Οι αναλύσεις των δειγμάτων έγιναν εις διπλούν για λόγους αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

Αναφορικά με την θερμική επεξεργασία των δειγμάτων, αυτή έγινε σε συνθήκες εργαστηρίου και πιθανόν να υπάρχουν αποκλίσεις από την βιομηχανική της εφαρμογή. Παρόλα αυτά οι συνθήκες που επιλέχθηκαν προσομοιάζουν τις σχέσεις χρόνου – θερμοκρασίας που χρησιμοποιούνται τόσο στη γαλακτοβιομηχανία όσο και σε μικρά τυροκομεία και κατά συνέπεια θεωρούνται ως αντιπροσωπευτικές για την εξυγίανση του γάλακτος. Παρόλα αυτά, προκειμένου να υπάρχει μια ασφαλιστική δικλείδα για την επιτυχημένη θερμική επεξεργασία, τα δείγματα ελέγχθηκαν μικροβιολογικά, πριν και μετά την επεξεργασία, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της.

Κατά το μικροβιολογικό έλεγχο των δειγμάτων γάλακτος, νωπών και παστεριωμένων, διαπιστώθηκε η μείωση στους πληθυσμούς τόσο για την OMX όσο και για τα εντεροβακτηριοειδή, γεγονός που ήταν αναμενόμενο και έμμεσα μπορεί να υποδηλώσει την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας. Θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο, εάν ο μικροβιολογικός έλεγχος πριν και μετά συμπληρωνόταν και με παθογόνα που θα μπορούσαν να ενοφθαλμιστούν στο νωπό γάλα.

Για τον έλεγχο της επιτυχούς παστερίωσης, σύμφωνα και με την κείμενη νομοθεσία, χρησιμοποιείται η δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης. Το ένζυμο αυτό καταστρέφεται σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία παστερίωσης, και ως εκ τούτου, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο ώστε να πιστοποιηθεί η παστερίωση. Από τα ποιοτικά (χρωματικά) τεστ που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε ότι το ακριβέστερο rapid ALP test, είναι το Kairosafe, της εταιρίας Lactopast. Βέβαια, τόσο αυτό, όσο και το Phosphatesmo δείχνουν να είναι έγκυρα για τα παστεριωμένα δείγματα, αφού τα αποτελέσματα ALP είναι αρνητικά. Ωστόσο, σε τρία δείγματα νωπού γάλακτος, υποδεικνύουν την μη ύπαρξη αλκαλικής φωσφατάσης. Τα δείγματα αυτά αναφέρονται σε γίδινο γάλα και ονόγαλα, αντίστοιχα. Στο τελευταίο όμως έχει αποδειχθεί το χαμηλό επίπεδο του ενζύμου σύμφωνα με την επιστημονική ομάδα του Marchand (2009) και απαιτείται άλλος τρόπος ανίχνευσης με μεγαλύτερη ικανότητα προσδιορισμού. Επομένως, εφόσον τα παραπάνω κιτ μπορεί να δώσουν αρνητικό αποτέλεσμα ALP για νωπό δείγμα αλλά και για τα υπόλοιπα δείγματά μας, τα οποία είναι παστεριωμένα και τα τρία ποιοτικά κιτ πιθανόν να οδηγούν σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Κατά συνέπεια η χρήση τους θα πρέπει να γίνεται με προσοχή, δεδομένου ότι μπορεί να συμβάλλουν στο χαρακτηρισμό

ακατάλληλων δειγμάτων ως ασφαλή για τον καταναλωτή, ειδικά στην περίπτωση του ονογάλακτος και του γάλακτος καμήλας.

Σε ό, τι αφορά τα κιτ που εκτελούν ποσοτικό προσδιορισμό, σημειώνεται ότι οι αποδεκτές τιμές για τα παστεριωμένα δείγματα, θα πρέπει να είναι κατώτερες των 350 mU/L. Για τα κιτ Zymosnap και Palsite, τα νωπά δείγματα φαίνεται να ελέγχονται σωστά. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τα δείγματα γάλακτος που έχουν υποστεί βραδεία παστερίωση, με εξαίρεση τα δείγματα γάλακτος καμήλας, που παρουσιάζονται θετικά στην ύπαρξη ALP. Ακόμη μεγαλύτερη ανακρίβεια παρουσιάζεται στα αποτελέσματα ελέγχου της ταχείας παστερίωσης, αφού εκτός από το γάλα καμήλας εμφανίζεται ως μη παστεριωμένο και το πρόβειο. Στην περίπτωση του κιτ Fluorophos, αρκετά είναι τα παστεριωμένα δείγματα που εμφανίζονται ψευδώς μη παστεριωμένα. Μόνο τα αποτελέσματα των δειγμάτων ονογάλακτος και βουβαλίσσιου γάλακτος είναι καθόλα έγκυρα. Στα υπόλοιπα, τουλάχιστον ένα, εμφανίζεται ως ψευδώς απαστερίωτο. Επομένως, και στα 3 κιτ το μόνο γάλα που φαίνεται να παρατηρείται πρόβλημα με την ανίχνευση του ενζύμου και τη σωστή παστερίωση του γάλακτος είναι αυτό της καμήλας.

Οι αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν τόσο στον ποιοτικό όσο και στον ποσοτικό προσδιορισμό, μπορεί να οφείλεται στο γεγονός πως το γάλα καμήλας είναι πιο ευαίσθητο, σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη, σε θερμοκρασιακές αλλαγές και αλλαγές στις συνθήκες περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα να υπάρχει η πιθανότητα της επανενεργοποίησης του ενζύμου. Η πιθανότητα επανενεργοποίησης της ALP ενέχει κίνδυνο για τις πρακτικές διασφάλισης ασφάλειας του γάλακτος και των προϊόντων του. Ακόμα κι αν το δείγμα γάλακτος δοκιμάστηκε για δραστηριότητα ALP μία έως δύο ημέρες μετά την αποθήκευση, υπάρχει πιθανότητα ψευδούς θετικού, το οποίο μπορεί να κοστίζει οικονομικά και να οδηγήσει σε περιττά απόβλητα και διάθεση του εν λόγω προϊόντος.

Συγκεκριμένα για όλα τα παραπάνω κιτ, το βουβαλίσιο γάλα που μελετήσαμε, φαίνεται να ανταποκρίνεται ικανοποιητικά με όλα τα τεστ, ποιοτικά και ποσοτικά. Σε αντίστοιχες έρευνες, τόσο οι μέθοδοι φθορισμού όσο και οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας έχουν παρόμοιες τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας σε αναλύσεις πλήρους γάλακτος πολλαπλών ειδών που ισχύουν για χαμηλότερα επίπεδα ALP για τη δημόσια ασφάλεια που έχουν υιοθετηθεί στις ΗΠΑ και προτείνονται στην ΕΕ. Επιπρόσθετα χαμηλότερα όρια ελέγχου είναι εφικτά στα 50 και 100 mU/L σύμφωνα με τους Salter et al.(2006). Σύμφωνα με τους Lombardi et al., η ALP του γάλακτος βουβάλου επιδεικνύει μέγιστη ευαισθησία απενεργοποίησης στους 60 °C, και απενεργοποιείται πλήρως στους 70 °C (Lombardi et al., 2000). Ενώ η αλκαλική φωσφατάση του γίδινου, αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, εμφανίζει ένα παρόμοιο μοτίβο, τόσο μεταξύ τους, όσο και με το βουβαλίσιο γάλα (Ahmad Punoo, 2018). Σε μελέτη που διεξήχθη από τη Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων (International Dairy Federation) και τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization) για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας μιας μεθόδου χημειοφωτάγειας για την ALP σε 50, 100, 350 και 500 mU / mL σε πλήρες γάλα πολλαπλών ειδών για την τήρηση νέων κανονισμών στις ΗΠΑ και τους προτεινόμενους κανονισμούς στην ΕΚ, δεκαπέντε (15) εργαστήρια από 8 χώρες αξιολόγησαν τα γάλατα βοοειδών, αιγών, προβάτων και βουβάλων, καθώς και αποβουτυρωμένο γάλα βοοειδών, κρέμα γάλακτος με 20% λιπαρά και σοκολατούχο γάλα με 2% λιπαρά. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αποκάλυψαν

ότι η μέθοδος ήταν συγκρίσιμη με τις φθορισμομετρικές δοκιμές, ενώ υπέδειξαν ότι η μέθοδος χημειοφωταύγειας είναι κατάλληλη για τη μέτρηση της ALP στο γάλα διαφόρων ειδών και σε υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα, στις ΗΠΑ και την ΕΕ, όπου το επίπεδο παστερίωσης, χρησιμοποιώντας σα δείκτη την ALP, είναι κάτω από τα 350 mU/L (Salter et al., 2006). Ωστόσο, το όριο των 350 mU/l για την ALP, όπως καθορίστηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση, επιτεύχθηκε κυρίως με τις θερμικές επεξεργασίες που εφαρμόστηκαν στη μελέτη των Lorenzen et al. (Lorenzen et al., 2010), οι οποίες είναι οι ίδιες με αυτές που αξιοποιήσαμε και εμείς. Προτείνουν, ωστόσο, πως πρέπει να διεξαχθούν περαιτέρω συνεργατικές μελέτες για την αξιολόγηση των οριακών τιμών για τη δραστηριότητα της ALP, σε μη αγελαδινά γάλατα που έχουν υποστεί θερμική κατεργασία. Ακόμη, τονίζουν πως θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι διαφορές μεταξύ των φυλών. Περαιτέρω, αποδείχθηκε ότι το ποσοστό των υπολειπόμενων ενζυματικών ενεργειών στο θερμικά κατεργασμένο γάλα, όχι αγελαδινής προέλευσης, ήταν σημαντικά υψηλότερο από ό, τι στο αγελαδινό γάλα (Lorenzen et al., 2010). Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα από την ανάλυση με το ZymoSnap, τα δείγματα που παστεριώθηκαν ταχέως αποφέρουν αποδεκτές τιμές για την ALP. Το ερώτημα σχετικά με το ποια ανάλυση θα έπρεπε να εμπιστευτούμε, λόγω της διακριτής διαφοράς μεταξύ τους, σύμφωνα με τους Klotz et al., αυτή είναι η Fluorophos, διότι τείνει να παρουσιάζεται περισσότερο ευαίσθητη και απαιτεί λιγότερη προετοιμασία, από τις λοιπές χρωματογραφικές. (Klotz et al., 2008). Αντίθετα, στη δική μας πειραματική διαδικασία αποδείχθηκε πως από άποψη αποτελεσμάτων η PasLite υπερτερούσε, αν και είχε πολύπλοκη προετοιμασία για το καλιμπραρισμό της συσκευής και την διαχείριση τόσο των δειγμάτων όσο και των αντιδραστηρίων.

Όπως έχουμε περιγράψει σε προηγούμενη ενότητα, το γάλα υποειδών διαθέτει, εν γένει, τα ίδια χαρακτηριστικά με το ονόγαλα, με αποτέλεσμα και τα ένζυμα αλκαλικής φωσφατάσης που εμπεριέχονται και στα δύο, να συμπεριφέρονται παρόμοια. Σε έρευνα των Marchand et al, το 2009, για την κινητική της αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα υποειδών, αποδείχτηκε ότι η αλκαλική φωσφατάση του, δεν μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο δείκτη παστερίωσης του εν λόγω γάλακτος. Αυτό οφείλεται στα ψευδή αποτελέσματα που προκύπτουν από την απενεργοποίηση της ALP. Επιπλέον, χαμηλά επίπεδα (<0,2%) μόλυνσης από νωπό γάλα στο παστεριωμένο προϊόν δεν μπορούν να ανιχνευθούν λόγω αυτών των χαμηλών ενδογενών επιπέδων ALP των υποειδών και των επακόλουθων περιορισμών ανίχνευσης της μεθόδου. Παρόλο, λοιπόν, που πράγματι πρόκειται για γάλα χωρίς παθογόνα, δεν μπορεί να διασφαλιστεί η χρήση της ALP ως δείκτης στη μέθοδο αναφοράς στην τρέχουσα μορφή του. Ωστόσο, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί μόνο σε περίπτωση που η μέθοδος αναφοράς ήταν 200 φορές πιο ευαίσθητη (π.χ. με αύξηση του χρόνου επώασης ή/και τη χρήση πιο ευαίσθητων υποστρωμάτων) (Marchand et al., 2009). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, τα επιλεγμένα κιτ ποιοτικού προσδιορισμού στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκαν κατάλληλα για το ονόγαλα, μιας και αποδεικνύεται πάντα απαλλαγμένο από ALP, ακόμα και όταν δεν έχει υποστεί παστερίωση, γεγονός που δεν ισχύει.

Όσον αφορά στο γάλα καμήλας, η επιστημονική ομάδα των Wernery et al., το 2008, βρήκαν ότι η αλκαλική φωσφατάση δε θα μπορούσε να αποτελεί αξιόπιστο δείκτη παστερίωσής του. Αυτό οφείλεται στη μεγαλύτερη θερμοκρασία που απαιτεί η ολική απενεργοποίηση του ενζύμου, σε σχέση με αυτή που εφαρμόζεται κατά τη θερμική κατεργασία του γάλακτος. Οι ίδιοι προτείνουν, εναλλακτικά, τη μελέτη άλλων ενζύμων, όπως η γαλακτο-υπεροξειδάση (POD) ή η γ-γλουταμυλική τρανσφεράση, καθώς

φαίνεται να είναι περισσότερο έγκυρα. Παρομοίως, και στην αραβική καμήλα, το συγκεκριμένο ένζυμο δεν απενεργοποιείται στους 72 °C, τη θερμοθετημένη θερμοκρασία ταχείας παστερίωσης. Σε αυτήν την περίπτωση, προτείνεται επίσης η γ-γλουταμυλική τρανσφεράση ως βιοδείκτης επιτυχημένης παστερίωσης (Wernery et al., 2008). Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται και στα πειράματα που διεξήχθησαν στο εργαστήριό μας. Στα δείγματα γάλακτος καμήλας που αναλύθηκαν ποσοτικά, οι τιμές της αλκαλικής φωσφατάσης ήταν πάντα πολύ αυξημένες στα kit ZymoSnap και Fluorophos. Ακόμη, από τα kit ποιοτικού προσδιορισμού, το γάλα καμήλας δεν εμφανίζεται ως επαρκώς παστεριωμένο από το kit Lactognost, τόσο για τα δείγματα που έχουν παστεριωθεί ταχέως, όσο και για αυτά που έχουν παστεριωθεί βραδέως.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω διαθέσιμα kit για την επάρκεια της ALP που κυκλοφορούν στην αγορά είναι κατάλληλα μόνο για το αγελαδινό είδος γάλακτος, όπως έχει αποδειχθεί και όχι για όλα ανεξαίρετως τα είδη γάλακτος. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με όσα είχε αναφέρει μια έρευνα που διενέργησαν οι Vamvakaki et al, το 2006, σύμφωνα με τους οποίους η θερμική επεξεργασία στο αιγοπρόβειο γάλα μπορεί να μειώσει πιο εύκολα και σε μεγαλύτερη ποσότητα την αλκαλική φωσφατάση. Επίσης, σχετικά με το ονόγαλα, στο οποίο βρήκαμε μικρά ποσοστά αλκαλικής φωσφατάσης, τόσο, στο νωπό, όσο και στο παστεριωμένο γάλα, αυτό, σύμφωνα με τους Marchand et al, το 2009, οφείλεται στο μικρό ποσοστό λίπους, το οποίο καθιστά χαμηλή τη δραστικότητα όλων των ενζύμων.

Είναι σημαντικό να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες για τα γάλατα που προέρχονται από όνο και καμήλα, ώστε να αξιολογηθούν κάποια άλλα ένζυμα- δείκτες, καταλληλότερα για την υπόδειξη της κατάλληλης παστερίωσης. Όπως επίσης θα ήταν χρήσιμο πιθανόν να διεξαχθούν μερικά ακόμα πειράματα χρησιμοποιώντας μεθόδους με διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας – χρόνου, ώστε να βρεθεί η κατάλληλη μέθοδος θερμικής απενεργοποίησης των ενζύμων για το κάθε είδος δείγματος.

## 5.2 Συμπεράσματα

Από την εν λόγω μεταπτυχιακή διατριβή, τα συμπεράσματα που εξάγουμε, συνοψίζονται παρακάτω:

- Η δοκιμή της ALP συστήνεται να γίνεται άμεσα μετά τη θερμική επεξεργασία, για την αποφυγή λανθασμένων αποτελεσμάτων, κυρίως λόγω επανενεργοποίησης του ενζύμου
- Όλα τα kit που χρησιμοποιήθηκαν, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έδωσαν, φαίνεται να μην είναι πάντα κατάλληλα για μη-αγελαδινά γάλατα και συστήνεται επιπλέον διερεύνηση
- Για την πιστοποίηση της παστερίωσης του γάλακτος καμήλας και όνου, η αλκαλική φωσφατάση φαίνεται να μην αποτελεί αξιόπιστο δείκτη

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahmad Punoo, H.** (2018). Validation of Milk Product Pasteurization by Alkaline Phosphatase Activity. *Concepts of Dairy & Veterinary Sciences*, 1(3), 78–89.
- Albillos, S. M., Reddy, R., & Salter, R.** (2011). Evaluation of alkaline phosphatase detection in dairy products using a modified rapid chemiluminescent method and official methods. *Journal of food protection*, 74(7), 1144-1154.
- Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Bernardo, A., & García-López, M. L.** (2002). Changes in the microflora of Valdeteja raw goat's milk cheese throughout manufacturing and ripening. *LWT - Food Science and Technology*, 35(3), 222–232.
- Ambrosoli, R., di Stasio, L., & Mazzocco, P.** (1988). Content of  $\alpha$ s1-casein and coagulation properties in goat milk. *Journal of Dairy Science*, 71(1), 24-28.
- Andrews, A. T.** (1992). Indigenous enzymes in milk. IV. Phosphatases in milk. *Advanced dairy chemistry-I: Proteins.*, (Ed. 2), 322-331.
- Angelino, P. D., Christen, G. L., Penfield, M. P., & Beattie, S.** (1999). Residual alkaline phosphatase activity in pasteurized milk heated at various temperatures—measurement with the Fluorophos and Scharer Rapid Phosphatase Tests. *Journal of food protection*, 62(1), 81-85.
- Angulo, F. J., LeJeune, J. T., & Rajala-Schultz, P. J.** (2009). Unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1), 93-100.
- Anifantakis, E. M., & Rosakis, P. S.** (1983). Alkaline phosphatase activity of sheep's milk and some factors affecting it. *Egyptian journal of dairy science*.
- Babaei, H., Mansouri-Najand, L., Molaei, M. M., Kheradmand, A., & Sharifan, M.** (2007). Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis. *Veterinary Research Communications*, 31(4), 419-425.
- Babson, A. L., & Greeley, S. J.** (1967). New substrate for alkaline phosphatase in milk. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 50(3), 555-557.
- Barbosa, M.** (2005). Interest in controlling alkaline phosphatase activity in sheep and goat milks. *International Dairy Federation special issue*, (3), 117-127.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Pothakamury, U. R., Gongora-Nieto, M. M., & Swanson, B. G.** (1999). *Preservation of foods with pulsed electric fields*. Elsevier.
- Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O.** (2002). Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends in Food Science & Technology*, 13(6-7), 195-204.



**Blel, M., Guingamp, M. F., Gaillard, J. L., & Humbert, G.** (2001). Improvement of a method for the measurement of lactoperoxidase activity in milk. *International dairy journal*, 11(10), 795-799.

**Bortolato, M., Besson, F., & Roux, B.** (2002). An infrared study of the thermal and pH stabilities of the GPI-alkaline phosphatase from bovine intestine. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(4), 874-879.

**Bylund, G.** (1995). *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB. Sweden.

**Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R., & Montel, M. C.** (2007). Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Systematic and applied microbiology*, 30(7), 547-560.

**Claeys, W. L., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E.** (2002). Kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase inactivation, and of [beta]-lactoglobulin denaturation in milk with different fat content. *The Journal of dairy research*, 69(4), 541.

**Codex Alimentarius Commission.** (2004). Draft code of hygienic practice for milk and milk products at step 8, Report of the thirty-sixth session of the codex committee on food hygiene. *Codex Alimentarius Commission Twenty-seventh Session, 2004*, 44-82.

**Deeth, H. C.** (2006). Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, 16(6), 555-562.

**Deeth, H. C., & Lewis, M. J.** (2017). *High temperature processing of milk and milk products*. John Wiley & Sons.

**Dumitraşcu, L., Stănciuc, N., Stanciu, S., & Râpeanu, G.** (2014). Inactivation kinetics of alkaline phosphatase from different species of milk using quinolyl phosphate as a substrate. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1773-1778.

**Eckner, K. F.** (1992). Fluorometric analysis of alkaline phosphatase inactivation correlated to Salmonella and Listeria inactivation. *Journal of food protection*, 55(12), 960-963.

**EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** (2015). Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*, 13(1), 3940.

**Ercolini, D., De Filippis, F., La Stora, A., & Iacono, M.** (2012). “Remake” by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(22), 8142-8145.

**European Food Safety Authority (EFSA), Clawin-Rädecker, I., De Block, J., Egger, L., Willis, C., Da Silva Felicio, M. T., & Messens, W.** (2021). The use of alkaline

phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. *EFSA Journal*, 19(4), e06576.

**Fadiloğlu, S., Erkmen, O., & Şekeroğlu, G.** (2006). Thermal inactivation kinetics of alkaline phosphatase in buffer and milk. *Journal of food processing and preservation*, 30(3), 258-268.

**Farkye, N. Y.** (2021). Phosphatases in Milk. In *Agents of Change* (pp. 85-99). Springer, Cham.

**Fenoll, J., Jourquin, G., & Kauffmann, J. M.** (2002). Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in solid and fluid dairy products. *Talanta*, 56(6), 1021-1026.

**Fernley, H. N., & Walker, P. G.** (1965). Kinetic behaviour of calf-intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphate. *Biochemical Journal*, 97(1), 95-103.

**Fleming, C. M., Farkye, N. Y., & Fox, P. F.** (2003). Indigenous phosphatases in milk. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (pp. 523-543). Springer, Boston, MA.

**Folley, S. J., & Kay, H. D.** (1936). Variations in the phosphomonoesterase content of the milk of the cow in relation to the progress of lactation. *Enzymologia*, 1.

**Food, W.** (2020). *STATISTICS STATISTICAL YEARBOOK*.

**Fotou, K., Tzora, A., Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Avgeris, I., ... & Demertzis, P. G.** (2011). Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe*, 17(6), 315-319.

**Fox, P. F., & Kelly, A. L.** (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. *International Dairy Journal*, 16(6), 517-532.

**Giner, J., Gimeno, V., Espachs, A., Elez, P., Barbosa-Cánovas, G. V., & Martín, O.** (2000). Inhibition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pectin methylesterase by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(1), 57-67.

**Girotti, S., Ferri, E., Ghini, S., Budini, R., & Roda, A.** (1994). Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase in milk. *Nederlands melk en Zuiveltijdschrift*, 48(4), 213-224.

**Goltzman, D., & Miao, D.** (2004). Alkaline phosphatase.

Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small ruminant research*, 51(2), 155-163.

**Guo, H. Y., Pang, K., Zhang, X. Y., Zhao, L., Chen, S. W., Dong, M. L., & Ren, F. Z.** (2007). Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *Journal of dairy science*, 90(4), 1635-1643.

**Harding F** (2007) E.U. Adopts a new reference for pasteurisation. Food and Beverage International 05 December 2007. Bath, UK: Zenith International Publishings

**Harding, F.** (1991). Alkaline phosphatase test as a measure of correct pasteurization. *Bulletin of the IDF*, 262, 33-34.

**Harding, F., & Garry, E.** (2005). Collaborative evaluation of a fluorometric method for measuring alkaline phosphatase activity in cow's, sheep's, and goat's milk. *Journal of food protection*, 68(5), 1047-1053.

**Hartman, A. M., & Dryden, L. P.** (1965). Vitamins in milk and milk products. *Vitamins in milk and milk products*.

**Hadjipanayiotou, M.** (1995). Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum of ewes and goats. *Small Ruminant Research*, 18(3), 255-262.

**Hilal, A. P.** Validation of milk product pasteurization by Alkaline Phosphatase Activity. Con Dai & Vet Sci 1 (3)-2018. *CDVS. MS. ID*, 113.

**Hoylaerts, M. F., Manes, T., & Millán, J. L.** (1997). Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22781-22787.

**Hülshager, H., Potel, J., & Niemann, E. G.** (1983). Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and environmental biophysics*, 22(2), 149-162.

**IZSLT (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “M. Aleandri”)** 2020. Sintesi - Attività della fosfatasi alcalina nel latte di pecora, capra e bufala in relazione al trattamento termico di pastorizzazione: studio sperimentale

**Juffs, H., & Deeth, H.** (2007). Scientific evaluation of pasteurisation for pathogen reduction in milk and milk products. Food Standards Australia New Zealand, Canberra, Australia.

**Kay, H. D., & Graham Jr, W. R.** (1933). Phosphorus compounds of milk. 6. The effect of heat on milk phosphatase. A simple method for distinguishing raw from pasteurised milk, raw from pasteurised cream, and butter made from raw cream from that made from pasteurised cream. *Journal of Dairy Research*, 5, 63-74.

**Khalesi, M., Salami, M., Moslehishad, M., Winterburn, J., & Moosavi-Movahedi, A. A.** (2017). Biomolecular content of camel milk: A traditional superfood towards future healthcare industry. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 49-58.

**Khamesipour, F., Dida, G. O., Anyona, D. N., Razavi, S. M., & Rakhshandehroo, E.** (2018). Tick-borne zoonoses in the Order Rickettsiales and Legionellales in Iran: A systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(9), e0006722.

- Kim, D. H., Chon, J. W., Lim, J. S., Kim, H. S., Kang, I. B., Jeong, D., ... & Seo, K. H.** (2016). Establishing quantitative standards for residual alkaline phosphatase in pasteurized milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(2), 194.
- Kim, E. E., & Wyckoff, H. W.** (1991). Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures: two-metal ion catalysis. *Journal of molecular biology*, 218(2), 449-464.
- Klotz, V., Hill, A., Warriner, K., Griffiths, M., & Odumeru, J.** (2008). Assessment of the colorimetric and fluorometric assays for alkaline phosphatase activity in cow's, goat's, and sheep's milk. *Journal of food protection*, 71(9), 1884-1888.
- KNIGHT, A. H., & FRYER, S. M.** (1989). The development of heat-resistant phosphatase activity in raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 42(3), 81-86.
- Kricka, L. J.** (2003). Clinical applications of chemiluminescence. *Analytica chimica acta*, 500(1-2), 279-286.
- Kumar, P., Sud, R. K., & Gupta, K. G.** (1973). Interference of some pesticides in the milk phosphatase pasteurization test. *Journal of dairy science*, 56(5), 553-557.
- Lakra, S., Jadhav, V. J., & Garg, S. R.** (2016). Development of a chromatographic method for the determination of alkaline phosphatase activity in pasteurized milk. *Food Analytical Methods*, 9(7), 2002-2009.
- Levieux, D., Geneix, N., & Levieux, A.** (2007). Inactivation-denaturation kinetics of bovine milk alkaline phosphatase during mild heating as determined by using a monoclonal antibody-based immunoassay. *Journal of dairy research*, 74(3), 296.
- Linden, G., & Alais, C.** (1978). Alkaline phosphatase in human, cow and sheep milks: molecular and catalytic properties and metal ion action. In *Annales de biologie animale biochimie biophysique* (Vol. 18, No. 3, pp. 749-758). EDP Sciences.
- Linden, G., Chappelet-Tordo, D., & Lazdunski, M.** (1977). Milk alkaline phosphatase. Stimulation by  $Mg^{2+}$  and properties of the  $Mg^{2+}$  site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 483(1), 100-106.
- Lombardi, P., Avallone, L., d'Angelo, A., Mor, T., & Bogin, E.** (2000). Buffalo-milk enzyme levels, their sensitivity to heat inactivation, and their possible use as markers for pasteurization. *Journal of food protection*, 63(7), 970-973.
- Lorenzen, P. C., Martin, D., Clawin-Rädecker, I., Barth, K., & Knappstein, K.** (2010). Activities of alkaline phosphatase,  $\gamma$ -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Ruminant Research*, 89(1), 18-23.

- Lorenzen, P. C., Wernery, R., Johnson, B., Jose, S., & Wernery, U.** (2011). Evaluation of indigenous enzyme activities in raw and pasteurised camel milk. *Small Ruminant Research*, 97(1-3), 79-82.
- Ludikhuyze, L., Claeys, W., & Hendrickx, M.** (2000). Combined pressure—temperature inactivation of alkaline phosphatase in bovine milk: a kinetic study. *Journal of Food Science*, 65(1), 155-160.
- Lyster, R. L. J., & Aschaffenburg, R.** (1962). The reactivation of milk alkaline phosphatase after heat treatment. *Journal of Dairy Research*, 29(1), 21-35.
- Ma, Y., Barbano, D. M., Hotchkiss, J. H., Murphy, S., & Lynch, J. M.** (2001). Impact of CO<sub>2</sub> addition to milk on selected analytical testing methods. *Journal of dairy science*, 84(9), 1959-1968.
- MacGibbon, A. K. H., & Taylor, M. W.** (2006). Composition and structure of bovine milk lipids. In *Advanced dairy chemistry volume 2 lipids* (pp. 1-42). Springer, Boston, MA.
- Mahato, K., & Chandra, P.** (2019). based miniaturized immunosensor for naked eye ALP detection based on digital image colorimetry integrated with smartphone. *Biosensors and Bioelectronics*, 128, 9-16.
- Mahmoudi, I., Moussa, O. B., Khaldi, T. E. M., Kebouchi, M., Soligot, C., Le Roux, Y., & Hassouna, M.** (2016). Functional in vitro screening of Lactobacillus strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research*, 137, 91-98.
- Manolkidis, K. S., Alichanidis, E. S., & Varvoglis, A. G.** (1971). Effects of some antibiotics on the milk phosphatase pasteurization test. *Journal of dairy science*, 54(3), 335-338.
- Marchand, S., Merchiers, M., Messens, W., Coudijzer, K., & De Block, J.** (2009). Thermal inactivation kinetics of alkaline phosphatase in equine milk. *International Dairy Journal*, 19(12), 763-767.
- Marshall, R. T.** (1992). Standard methods for the examination of dairy products.
- Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M.** (2018). Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *Journal of dairy science*, 101(1), 861-870.
- McComb, R. B., Bowers, G. N., & Posen, S.** (1979). Measurement of alkaline phosphatase activity. In *Alkaline phosphatase* (pp. 289-372). Springer, Boston, MA.
- McLauchlin, J., Aird, H., Elliott, A., Forester, E., Jørgensen, F., & Willis, C.** (2020). Microbiological quality of raw drinking milk and unpasteurised dairy products: results from England 2013–2019. *Epidemiology & Infection*, 148.

**MICCICHE, K.** (2005). Regulation & pasteurisation. Dairy industries international, 70(11), 44-45.

**Milan J.L.** Alkaline phosphatases structure , substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes Purinergic Signal 2006 2. CrossRef PubMed PubMed Central

**Millogo, V., Sjaunja, K. S., Ouédraogo, G. A., & Agenäs, S.** (2010). Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. *Food control*, 21(7), 1070-1074.

**Mistry, V. V.** (1989). Thermal inactivation characteristics of alkaline phosphatase in ultrafiltered milk. *Journal of dairy science*, 72(5), 1112-1117.

**Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F.** (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International journal of food microbiology*, 177, 136-154.

**Mottola, A., Alberghini, L., Giaccone, V., Marchetti, P., Tantillo, G., & Di Pinto, A.** (2018). Microbiological safety and quality of Italian donkey milk. *Journal of Food Safety*, 38(3), e12444.

**Mowlem, A.** (2005). Marketing goat dairy produce in the UK. *Small Ruminant Research*, 60(1-2), 207-213.

**Murthy, G. K., & Kaylor, L. O.** (1990). Evaluation of APHA and AOACII Methods for Phosphatase in Butter and Differentiation of Milk and Microbial Phosphatases by Agarose-Gel Electrophoresis. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73(5), 681-687.

**Murthy, G. K., Cox, S., & Kaylor, L.** (1976). Reactivation of alkaline phosphatase in ultra high-temperature, short-time processed liquid milk products. *Journal of dairy science*, 59(10), 1699-1710.

**Murthy, G. K., Kleyn, D. H., Richardson, T., & Rocco, R. M.** (1992). Alkaline phosphatase methods. *Standard methods for the examination of dairy products*, 413-431.

**Murthy, G. K., & Peeler, J. T.** (1979). Rapid methods for differentiating reactivated from residual phosphatase in milk and cream: Collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62(4), 822-827.

**Painter, C. J., & Bradley Jr, R. L.** (1997). Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time-temperature treatments. *Journal of Food Protection*, 60(5), 525-530.

**Papathanasiou, A.** (2005). Health status of the Neolithic population of Alepotrypa Cave, Greece. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 126(4), 377-390.



- Payne, C., & Wilbey, R. A.** (2009). Alkaline phosphatase activity in pasteurized milk: A quantitative comparison of Fluorophos and colourimetric procedures. *International journal of dairy technology*, 62(3), 308-314.
- Pehrsson, P. R., Haytowitz, D. B., Holden, J. M., Perry, C. R., & Beckler, D. G.** (2000). USDA's national food and nutrient analysis program: food sampling. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(4), 379-389.
- Pino, A., Liotta, L., Randazzo, C. L., Todaro, A., Mazzaglia, A., De Nardo, F., ... & Caggia, C.** (2018). Polyphasic approach to study physico-chemical, microbiological and sensorial characteristics of artisanal Nicastrese goat's cheese. *Food microbiology*, 70, 143-154.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D.** (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 664-698.
- Rademacher, B., & Hinrichs, J.** (2006). Effects of high pressure treatment on indigenous enzymes in bovine milk: Reaction kinetics, inactivation and potential application. *International dairy journal*, 16(6), 655-661.
- Rafiq, S., Huma, N., Pasha, I., Sameen, A., Mukhtar, O., & Khan, M. I.** (2016). Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(7), 1022.
- Rankin, S. A., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D. S., & Lopez-Hernandez, A.** (2010). Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *Journal of dairy science*, 93(12), 5538-5551.
- Richardson, L. A., McFarren, E. F., & Campbell, J. E.** (1964). Phosphatase reactivation. *Journal of Dairy Science*, 47(2), 205-210.
- Ritota, M., Di Costanzo, M. G., Mattera, M., & Manzi, P.** (2017). New trends for the evaluation of heat treatments of milk. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2017.
- Rocco, R. M.** (1990). Fluorometric determination of alkaline phosphatase in fluid dairy products: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73(6), 842-849.
- Rocco, R. M.** (2004). Chapter 14 Alkaline Phosphatase Methods . In *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. American Public Health Association.
- Rola, J. G., & Sosnowski, M.** (2010). Determination of alkaline phosphatase activity in milk and milk products by fluorimetric method. *Bull Vet Inst Pulawy*, 54, 537-542.
- Salter, R. S., & Fitchen, J.** (2006). Evaluation of a Chemiluminescence Method for Measuring Alkaline Phosphatase Activity in WholeMilk of Multiple Species and Bovine Dairy Drinks: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*, 89(4), 1061-1070.

- Scharer, H.** (1938). A rapid phosphomonoesterase test for control of dairy pasteurization. *Journal of Dairy Science*, 21(1), 21-34.
- Scharer, H.** (1943). Laboratory Control of Milk under War Conditions: The Rapid Phosphatase Test. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 33(4), 396-398.
- Schlimme, E., Kiesner, C., Lorenzen, P. C., & Martin, D.** (1997). Chemical process parameters for thermal inactivation of alkaline phosphatase in milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 49(3), 207-219.
- Schoenbach, K. H., Joshi, R. P., Stark, R. H., Dobbs, F. C., & Beebe, S. J.** (2000). Bacterial decontamination of liquids with pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 7(5), 637-645.
- Shamsi, K., Versteeg, C., Sherkat, F., & Wan, J.** (2008). Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 217-223.
- Sharma, R. S., & Ganguli, N. C.** (1974). Purification and properties of reactivated alkaline phosphatase from buffalo milk. *Milchwissenschaft*.
- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R.** (2014). Alkaline phosphatase: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269-278.
- Stack, A., & Sillen, G.** (1998). Bactofugation of liquid milks. *Nutrition & Food Science*.
- Tamime, A. Y. (Ed.).** (2009). *Milk processing and quality management*. John Wiley & Sons.
- Tang, Z., Chen, H., He, H., & Ma, C.** (2019). Assays for alkaline phosphatase activity: progress and prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 32-43.
- Tiedeman, W. D.** (1943). Laboratory Control of Milk under War Conditions. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 33(4), 401-403.
- Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., ... & Piras, C.** (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, 103534.
- Töpel, A.** (2015). *Chemie und physik der milch*. Behr's Verlag DE.
- Vamvakaki, A. N., Zoidou, E., Moatsou, G., Bokari, M., & Anifantakis, E.** (2006). Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk. *Small Ruminant Research*, 65(3), 237-241.

**Van Winckel, M., Velde, S. V., De Bruyne, R., & Van Biervliet, S.** (2011). Clinical practice. *European journal of pediatrics*, 170(12), 1489-1494.

**Vega-Warner, A. V., Gandhi, H., Smith, D. M., & Ustunol, Z.** (2000). Polyclonal-antibody-based ELISA to detect milk alkaline phosphatase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2087-2091.

**Vega-Warner, A. V., Wang, C. H., Smith, D. M., & Ustunol, Z.** (1999). Milk alkaline phosphatase purification and production of polyclonal antibodies. *Journal of food science*, 64(4), 601-605.

**Verraes, C., Claeys, W., Cardoen, S., Daube, G., De Zutter, L., Imberechts, H., ... & Herman, L.** (2014). A review of the microbiological hazards of raw milk from animal species other than cows. *International Dairy Journal*, 39(1), 121-130.

**Wernery, U., Maier, U., Johnson, B., George, R. M., & Braun, F.** (2006). Comparative study on different enzymes evaluating heat treatment of dromedary milk. *Milchwissenschaft*, 61(3), 281-285.

**Wilińska, A., Bryjak, J., Illeová, V., & Polakovič, M.** (2007). Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. *International Dairy Journal*, 17(6), 579-586.

**Williams, D. J.** (1986). A modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test suitable for goat's milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 41(1), 28.

**Williams, D. J., & Nottingham, S. M.** (1990). Suitability of a modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test for goats' milk: collaborative study. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45(1), 21-23.

**Willis, C., Jørgensen, F., Aird, H., Elviss, N., Fox, A., Jenkins, C., ... & McLauchlin, J.** (2018). An assessment of the microbiological quality and safety of raw drinking milk on retail sale in England. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 535-546.

**Wright, R. C., & Tramer, J.** (1953). 510. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. I. *Journal of Dairy Research*, 20(2), 177-188.

**Wright, R. C., & Tramer, J.** (1956). 632. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment: IV. The influence of certain metallic ions. *Journal of Dairy Research*, 23(2), 248-256.

**Yoshitomi, K.** (2004). Alkaline phosphatase activity in cheeses measured by fluorometry. *International journal of food science & technology*, 39(3), 349-353.

**Zimmermann, U.** (1986). Electrical breakdown, electroporabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 105*, 175-256.

### **Ηλεκτρονική βιβλιογραφία- Ιστοσελίδες**

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple\\_Pasteurization.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Simple_Pasteurization.png)

[https://drawell-lab.en.alibaba.com/product/60336338656-801043208/DRAWELL\\_BRAND\\_Lab\\_Fluorescence\\_Spectrophotometer\\_F96\\_PRO.html](https://drawell-lab.en.alibaba.com/product/60336338656-801043208/DRAWELL_BRAND_Lab_Fluorescence_Spectrophotometer_F96_PRO.html)

<https://www.indiamart.com/proddetail/chemiluminescence-analyzer-21293764348.html>

